

ALEXANDRE AKIRA TAKAMATSU

**AVALIAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS
PESADOS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO
THIOBACILLUS EM LODOS BIOLÓGICOS PARA
UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA COMO FERTILIZANTE**

Tese de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre. Curso de Mestrado em Ciência do Solo, Subárea Microbiologia do Solo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

1995

ALEXANDRE AKIRA TAKAMATSU

AVALIAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO
Thiobacillus EM LODOS BIOLÓGICOS PARA UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA COMO FERTILIZANTE

Tese de Mestrado apresentada como
requisito parcial à obtenção do Grau de
Mestre.

Curso de Mestrado em Ciência do Solo
Subárea Microbiologia do Solo

Setor de Ciências Agrárias

Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Antônio Sálvio
Mangrich

Curitiba
1995

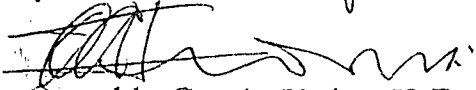
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO
"MESTRADO"

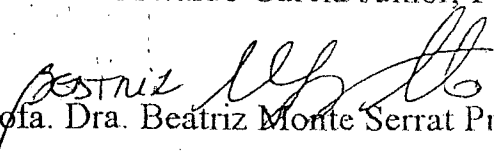
P A R E C E R

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pelo candidato **ALEXANDRE AKIRA TAKAMATSU**, com o título: **"Avaliação da biolixiviação de metais pesados por bactérias do gênero Thiobacillus em lodos biológicos para utilização agrícola como fertilizante"** para obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, são de Parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação com média 9,5 com o conceito **"A"** completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de Mestre em Agronomia-Área de Concentração **"Ciência do Solo"**

Secretaria do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba 02 de abril de 1996.


Prof. Dr. Antônio Salvio Mangrich, Presidente.


Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior, Iº Examinador.


Prof. Dra. Beatriz Monte Serrat Prevedello, IIº Examinador

ALEXANDRE AKIRA TAKAMATSU

AVALIAÇÃO DA BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR BACTÉRIAS DO GÊNERO
Thiobacillus EM LODOS BIOLÓGICOS PARA UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA COMO FERTILIZANTE

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo -
Subárea Biologia do Solo da Universidade Federal do Paraná, pela
Comissão formada pelos professores:

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich
Setor de Ciências Exatas, UFPR

Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr.
Departamento de Bioquímica - UNESP Araraquara

Profa. Beatriz Monserrat Prevedello
Setor de Ciências Agrárias, UFPR

Curitiba. 02 de Abril de 1996

AGRADECIMENTOS

Pode a ponta de um iceberg dar idéia do restante que se esconde por debaixo d'água ?
Aqui vai uma tentativa

À Bete, minha esposa e ao Léo, meu filho,
que mais foram privados dos laços que constituem uma família no período de
realização deste trabalho.

Ao Professor Mangrich, pela confiança a mim delegada, sem a qual este trabalho
não seria possível.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, por ser o principal financiador
deste trabalho de pesquisa, e pela confiança a mim depositada.

Ao Fundo Bunka/Banco Sumitomo pelo reconhecimento da importância deste
trabalho e pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, que contra vários tabus, me educaram de forma a me preparar para
trabalhar na área que eu realmente gostasse

À minha irmã Mônica, não mais presente neste mundo, mas que sempre tive a
certeza, esteve ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Fábio e Minoru pela paciência de terem me como irmão mais
velho.

Ao Corpo Docente da Universidade Federal do Paraná por terem a difícil e explícita
missão de formação de profissionais para a sociedade.

Aos amigos, que independente de meu humor sempre estiveram ao meu lado.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE TABELAS</u>	IV
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	V
<u>RESUMO</u>	VI
<u>ABSTRACT</u>	VII
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1 TRATAMENTO DE EFLUENTES	6
2.1.1 COMPOSIÇÃO DO LODO DE ESGOTO DOMÉSTICO	6
2.1.1.1 Composição do esgoto	7
2.1.1.1.1 Propriedades orgânicas	9
2.2 MICROBIOLOGIA DE LODOS	11
2.2.1 MICRORGANISMOS E O CONTROLE DA POLUIÇÃO	11
2.2.2 DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA	14
2.2.2.1 Os patógenos originários da água	14
2.2.2.2 Organismos indicadores	14
2.2.2.3 <i>Escherichia coli</i> e os coliformes	16
2.2.2.4 <i>Streptococcus</i> fecais	17
2.2.2.5 Relação de coliformes fecais / <i>Streptococcus</i> fecais	18
2.3 BIOHIDROMETALURGIA	18
2.3.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA BIOLIXIVIAÇÃO	19
2.3.2 PROCESSOS COMERCIAIS	20
2.3.3 LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE COBRE	20
2.3.4 LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE URÂNIO	21
2.4 METAIS PESADOS	22
2.4.1 DEFINIÇÃO DE METAIS PESADOS	22
2.4.1.1 Cádmio	22
2.4.1.1.1 Origem do cádmio nos solos	24
2.4.1.1.2 Concentração de cádmio nos solos	24
2.4.1.1.3 Cádmio em lodos de esgoto	25
2.4.1.2 Cobre	26
2.4.1.2.1 Cobre em lodos de esgoto	28
2.4.1.3 Chumbo	28
2.4.1.3.1 Chumbo em lodos de esgoto	29
2.4.1.4 Zinco	29
2.4.1.4.1 O Zinco em lodos de esgoto	30
2.4.2 PAPEL DOS ELEMENTOS INORGÂNICOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL	31
2.4.3 EFEITOS DOS METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS	32

2.5 APLICABILIDADE DAS TÉCNICAS BIOHIDROMETALÚRGICAS NA DESCONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS	32
2.5.1 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS	33
2.5.1.1 Biológicos	33
2.5.1.1.1 Acumulação de metais nas células de microrganismos	33
2.5.1.2 Químicos	34
2.5.1.2.1 Lixiviação ácida	34
2.5.1.2.2 Tratamento com EDTA	34
2.5.1.3 Químico-biológicos	34
2.5.1.3.1 Bactérias oxidantes de ferro nativas e adaptadas do próprio lodo	34
2.5.1.3.2 Bactérias oxidantes de ferro exóticas ao lodo	34
2.6 DISPOSIÇÃO DO LODO EM SOLO	34
2.7 MECANISMOS DE LIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	35
2.7.1 DIRETO	35
2.7.2 INDIRETO	35
2.8 GÊNERO <i>THIOBACILLUS</i>	37
2.9 <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	38
2.10 TEORIA DE MONOD E SUA APLICAÇÃO NA CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE CULTURAS DE <i>THIOBACILLUS</i>	39
2.11 FIXAÇÃO DE CO₂ EM MICRORGANISMOS	40
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>42</u>
3.1 - ESQUEMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO TRABALHO DE TESE	42
3.2 AMOSTRA.....	42
3.3 REAGENTES	43
3.4 SELEÇÃO DOS METAIS PESADOS ESTUDADOS.....	43
3.5 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METAIS PESADOS ESTUDADOS...	44
3.6 EQUIPAMENTOS.....	45
3.7 MEIOS DE CULTIVOS	45
3.7.1 MEIO 9K MODIFICADO EM CONCENTRAÇÃO SIMPLES PARA <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	47
3.7.2 MEIO T&K	48
3.7.3 MEIO T&K MODIFICADO.....	49
3.8 MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO DE <i>THIOBACILLUS</i> DE LODOS DE ESGOTOS.....	50
3.8.1 MÉTODO MODIFICADO DE OBTENÇÃO DE UMA CULTURA ENRIQUECIDA DE <i>THIOBACILLUS</i>	52
3.9 MÉTODO ELETROQUÍMICO COMO FORMA DE ACOMPANHAR A VELOCIDADE DE OXIDAÇÃO DO ÍON FERROSO A ÍON FÉRRICO NA PRESENÇA DE <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>.....	53
3.10 MÉTODO DA 1,10 - FENANTROLINA PRA DETERMINAÇÃO DE Fe (II).....	54
3.11 MÉTODO DE SÍNTESE DOS SULFETOS DE METAIS PESADOS	55
3.12 MÉTODO DE ANÁLISE DE METAIS PESADOS	55
3.13 CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL.....	56

3.13.1 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DO LODO	56
3.14 LODO ARTIFICIAL	61
3.15 CONFIRMAÇÃO DE ESPÉCIE	64
3.16 EXPERIMENTO DE BIO-LIXIVIAÇÃO	65
3.17 DESCRIÇÃO	65
3.17.1 TRATAMENTO 1 (T1)	65
3.17.2 TRATAMENTO 2 (T2)	65
3.17.3 TRATAMENTO 3 (T3)	65
3.17.4 TRATAMENTO 4 (T4)	65
3.17.5 VARIÁVEIS MONITORADAS	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 MÉTODO ELETROQUÍMICO.....	67
4.2 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	68
4.3 LODO ARTIFICIAL	70
4.4 ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DE <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	70
4.4.1 MÉTODO MODIFICADO DE OBTENÇÃO DE UMA CULTURA ENRIQUECIDA DE <i>THIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	70
4.4.2 MEIO DE CULTURA.....	75
4.5 SÍNTESE DOS SULFETOS DE METAIS PESADOS.....	75
4.6 BIO-LIXIVIAÇÃO.....	76
5. CONCLUSÃO.....	82
6. GLOSSÁRIO	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VARIAÇÕES E MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO EM SOLOS (MG/KG) (ALLOWAY, 1993)	25
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO EM LODOS BIOLÓGICOS (ALLOWAY, 1993)	26
TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS	43
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO MÁXIMA PERMITIDA DE METAIS PESADOS (MG/KG PESO SECO) EM LODOS CONSIDERADOS ACEITÁVEIS PARA USO AGRÍCOLA (WEBBER ET AL., 1983)	45
TABELA 5 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	45
TABELA 6 - REAGENTES PARA PREPARO DA SOLUÇÃO-PADRÃO 234 MV	53
TABELA 7 - REAGENTES PARA PREPARO DA SOLUÇÃO 300 MV	54
TABELA 8 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM - SANEPAR (CURITIBA, 1995)	57
TABELA 9 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS (%) E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM	58
TABELA 10 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODOANAERÓBIO DE RALF'S (REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO)	59
TABELA 11 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO)	60
TABELA 12 - LEITURAS ELETROQUÍMICAS DAS SOLUÇÕES-PADRÃO DE CALIBRAÇÃO	68
TABELA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO ELETROQUÍMICO E O ESPECTROFOTOMÉTRICO - REPETIÇÃO	70
TABELA 14 - PRIMEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS	71
TABELA 15 - SEGUNDO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS	72
TABELA 16 - TERCEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS	73
TABELA 17 - QUARTO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS	74
TABELA 18 - DETERMINAÇÃO DA PUREZA DOS SULFETOS DE METAIS SINTETIZADOS	75
TABELA 19 - VALORES DO POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUÇÃO (MV) MONITORADOS AO LONGO DO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO	76
TABELA 20 - VALORES DE PH MONITORADOS AO LONGO DO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO	76
TABELA 21 - DETERMINAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO - TRATAMENTO 1 (SOMENTE LODO)	77
TABELA 22 - DETERMINAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO - TRATAMENTO 2 (LODO + METAIS PESADOS)	77
TABELA 23 - DETERMINAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO - TRATAMENTO 3 (LODO + METAIS PESADOS + ÁCIDO SÚLFÚRICO (PH 4,0 + SULFATO FERROSO)	78
TABELA 24 - DETERMINAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO - TRATAMENTO 4 (LODO + METAIS PESADOS + ÁCIDO SÚLFÚRICO (PH 4,0) + SULFATO FERROSO + INÓCULO DE <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>)	78
TABELA 25 - DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROPRIEDADES FERTILIZANTES DO LODO	80
TABELA 26 - PRODUTOS DE SOLUBILIDADE (KPS) DOS SULFETOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NOS SOLOS, E AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NAS PLANTA (ALLOWAY, 1990).....	5
FIGURA 2 - MODELO DE CURVA DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS EM CULTURA PURA (CETESB, 1992).....	12
FIGURA 3 - SUCESSÃO ECOLÓGICA DE ORGANISMOS EM LODOS ATIVADOS.....	13
FIGURA 4 - DIAGRAMA DE VENN-EULER MOSTRANDO AS INTERAÇÕES ENTRE AS VÁRIAS CIÊNCIAS RELACIONADAS À MICROBIOLOGIA E A BIOHIDROMETALURGIA (ROSSI, 1990).....	19
FIGURA 5 - ESQUEMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE A TESE.....	42
FIGURA 6 - ESQUEMA DA METODOLOGIA ORIGINAL DE ENRIQUECIMENTO DE TIOBACILUS DE LODOS BIOLÓGICOS.....	51
FIGURA 7 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM - SANEPAR (CURITIBA , 1995).....	57
FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DE GRÁFICOS MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM.....	58
FIGURA 9 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO).....	59
FIGURA 10 - SEQUÊNCIA DE GRÁFICOS MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO).....	60
FIGURA 11 - ESQUEMA DE CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL.....	62
FIGURA 12 - LEITURAS ELETROQUÍMICAS DAS SOLUÇÕES-PADRÃO DE CALIBRAÇÃO.....	68
FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO ELETROQUÍMICO E O ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	69
FIGURA 14 - PRIMEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS.....	71
FIGURA 15 - SEGUNDO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS.....	72
FIGURA 16 - TERCEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS.....	73
FIGURA 17 - QUARTO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS.....	74
FIGURA 18 - PORCENTAGENS DE SOLUBILIZAÇÃO DO ZINCO NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS.....	81

RESUMO

A disposição em solos agrícolas e florestais de lodos resultantes de estações de tratamento de esgoto vem sendo amplamente revisada e questionada nos países que se utilizam desta prática. Embora isto venha a resolver um problema sério de falta de espaço e alto custo de destinação do lodo, e ainda substituindo parcialmente as necessidades de adubação química, os problemas de acréscimo de metais pesados aos solos através do lodo e a presença de patógenos se constituem hoje no principais fatores de restrição de uso. Apesar deste método de disposição não ser muito utilizado ainda, a tendência é de aumento, pois houve um crescimento expressivo no número de Estações de Tratamento de Esgoto, criando uma demanda para destinação do lodo gerado. Com relação aos níveis de metais pesados, a preocupação tem sido quanto aos efeitos cumulativos destes metais, pois a legislação dos países onde a disposição agrícola do lodo já é utilizada tende a ficar cada vez mais rígida, baixando os limites aceitáveis pela legislação. Este trabalho avaliou a eficiência de bio-lixiviação de metais pesados por bactérias do gênero *Thiobacillus* em lodos ativados, assim como caracterizou química e biologicamente o lodo antes e depois do processo de bio-lixiviação, e trabalhou nos isolamentos de microrganismos nativos do lodo capazes de lixiviar metais pesados. As eficiências de bio-lixiviação alcançadas para os quatro elementos considerados neste estudo foram: Cd (95%); Pb (95%); Cu (95%); Zn (50%). As propriedades fertilizantes não foram afetadas pelo processo.

Palavras-chave: *Thiobacillus*, metais-pesados, biohidrometalurgia, biolixiviação, lodos aeróbios, disposição agrícola

ABSTRACT

The sludge disposal in agricultural and forest soils resulting from sewage treatment plants has been widely revised and questioned in countries that use this practice. Therefore solving a serious lack of space and high cost destination problem and partially substituting the chemical fertilizers necessity, the problem of heavy metals loading in soils through sludge and the presence of pathogens are the main reasons of use restriction. In spite of this disposal method has not been used in Brazil, the tendency is to increase, because there was an expressive growing in the number of sewage treatment plants, creating a demand for the sludge generated. The heavy metal level preoccupation is related with cumulative effects, because the countries laws, where the agricultural disposal of sludge was adopted, are becoming more rigid, lowering the acceptable levels. This work evaluated the heavy metals bioleaching efficiency by *Thiobacillus* bacteria genera in activated sludges and characterized biologically and chemically the sludge after and before the bioleaching process and worked in native microorganisms isolation that is able to leach heavy metals. The bioleaching efficiency reached for the 4 elements considered in this study were: Cd (95%); Pb (95%); Cu (95%); Zn (50%). The fertilizer properties were not affected by this process

Keywords: *Thiobacillus*, heavy-metals, biohydrometallurgy, bioleaching, aerobic sludge, agricultural disposal

1. INTRODUÇÃO

O tratamento biológico de resíduos, cada vez mais utilizado como método de diminuição da carga poluente nos rios emitida por indústrias e pela população em geral, cria um outro problema, que é a destinação do lodo biológico originário deste tratamento. Das várias alternativas disponíveis incineração, descarte oceânico, o uso agrícola como fertilizante é o mais promissor, pois ao contrário das outras opções, propõe o seu reaproveitamento em benefício da agricultura.

Prática relativamente recente a nível nacional, mas utilizada a tempos em outros países (JEWEL, W.J. 1975; KORENTAJER, L. 1991), é o uso de lodos biológicos de Estações de Tratamento de Esgotos (ETE's) como fertilizante agrícola. A razão disto não se deve exatamente à propriedades fertilizantes excepcionais, mas sobretudo porque vem dar um destino de baixo custo à estes lodos, que de outra maneira, dependendo da sua classificação de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT¹, teriam que ser realocados para aterros sanitários, que normalmente contaminam lençóis freáticos e tem alto custo operacional. É principalmente neste ponto que devemos atentar para que esta não seja mais uma panacéia miraculosa que venha a dar uma solução à todos os segmentos da indústria e de esgotos domésticos, que gerem lodos biológicos.

Quando se trata da disposição agrícola do lodo de esgoto, dois aspectos principais devem ser levados em consideração: sanidade e metais pesados, sendo este último, o principal fator de restrição na utilização deste processo

Este trabalho se propõe avaliar em carácter exploratório, o método de biolixiviação em lodos biológicos, utilizando bactérias do gênero *Thiobacillus*, normalmente encontradas nos lodos, e que possuem metabolismo adequado em pH ácido, objetivando:

- a) Isolar microrganismos do lodo capazes de lixiviar metais pesados;

¹ ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas . NBR 10004 - Resíduos Sólidos. 63 p. 1987.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas . NBR 10005 - Lixiviação de Resíduos. 10p. 1987.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas . NBR 10006 - Solubilização de Resíduos. 2 p. 1987.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas . NBR 10007 - Amostragem de Resíduos. 25 p. 1987.

- b) Avaliar a eficiência de lixiviação de metais pesados por microrganismos isolados do próprio lodo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um marco na história da humanidade foi a transição da vida nômade para a vida fixa, e o fato que proporcionou isto foi o aprendizado das técnicas básicas de cultivo agrícola, pois a partir deste momento não era mais necessário mudar de local devido a escassez de alimentos. Baseado principalmente nisto é que se fundamentaram as bases da nossa sociedade e hoje a agricultura é de valor econômico e estratégico em todas as nações do mundo.

Após uma série de excessos e manejos incorretos que os solos agrícolas sofreram ao longo do tempo, estamos aos poucos, aprendendo a maneja-los com mais sabedoria para que possa ser utilizado permanentemente como matriz geradora de alimentos para a população.

A legislação que regulamenta a liberação e comercialização de pesticidas, fertilizantes e substâncias químicas tem ficado mais rígida ao se constatar inúmeros casos de contaminações em solos resultantes do uso abusivo ou disposição de resíduos (MILLER & MILLER, 1991). Nenhum país pode considerar sua legislação como a ideal ou definitiva, pois esta é uma área do conhecimento em constante evolução, e novos conceitos vem à tona a cada momento, e que afetam no seu uso. O efeito sinérgico existente entre os diversos poluentes, devido a sua dificuldade de avaliação, dificilmente é considerado, provocando impacto ambiental. Um bom exemplo disto é o efeito sinérgico entre o cobre e o zinco em lodo aeróbio (CIMINO & CARISTI, 1990), e entre o cádmio e zinco (ATTAR & MALI, 1982) onde se observou uma potencialização do efeito tóxico destes metais quando estes pares de elementos se encontram disponíveis.

O aspecto da sanidade do lodo visa averiguar a não existência de fitopatógenos ou zoopatógenos no lodo, que venham a prejudicar a produção agrícola, o solo, as pessoas que tenham contato direto (trabalhadores rurais) ou indireto (consumidor final). No trabalho que vem sendo desenvolvido pela Sanepar - Companhia de Saneamento do Paraná (Curitiba - PR) de viabilização agrícola do lodo biológico, um dos aspectos mais preocupantes da sanidade é a eliminação de ovos e cistos de helmintos (BARBIER et al., 1990).

A problemática de altos níveis de metais pesados no lodo é o aspecto mais importante a ser levado em conta quando se visa o aproveitamento agrícola, pois a contaminação de metais

pesados nos solos causa problemas irreversíveis, não existindo ainda métodos economicamente viáveis de descontaminação (CALVET et al., 1990), inutilizando o mesmo para produção de alimentos (BORDIGNON et al., 1987).

Os efeitos da aplicação prolongada de lodos com níveis de metais pesados, ainda que abaixo dos limites permissíveis pela legislação, não eliminam o problema cumulativo destes elementos no solo (AKHTER, 1990; BERTHET et al., 1989; BALZER & AHRENS, 1990; CHANEY, 1989; GILLER & McGRATH, 1989; KELLER, 1989; PETRUZZELLI, 1989; REED et al., 1991), além de se terem algumas evidências de que a flora microbiana adaptada à altas concentrações de metais no solo, tem sua capacidade de degradação de compostos aromáticos sensivelmente reduzida (DOELMAN et al., 1994; WILD et al., 1991).

Os metais adicionados ao solo através do lodo podem mudar sua espécie química (DUDKA & CHLOPECKA, 1990) mas também podem persistir no solo em uma forma extraível e disponível à absorção pelas plantas por vários anos (BERROW & BURRIDGE, 1990; AMRHEIN et al., 1994; BARON et al., 1990), além de poderem também migrar para os diversos horizontes do solo (DOWDY et al., 1991).

O efeito de acumulação ao longo da cadeia trófica pode ser observado tanto em ambientes terrestres como aquáticos (BOLDRINI et al., 1987; BROWN & OVERCAMP, 1992).

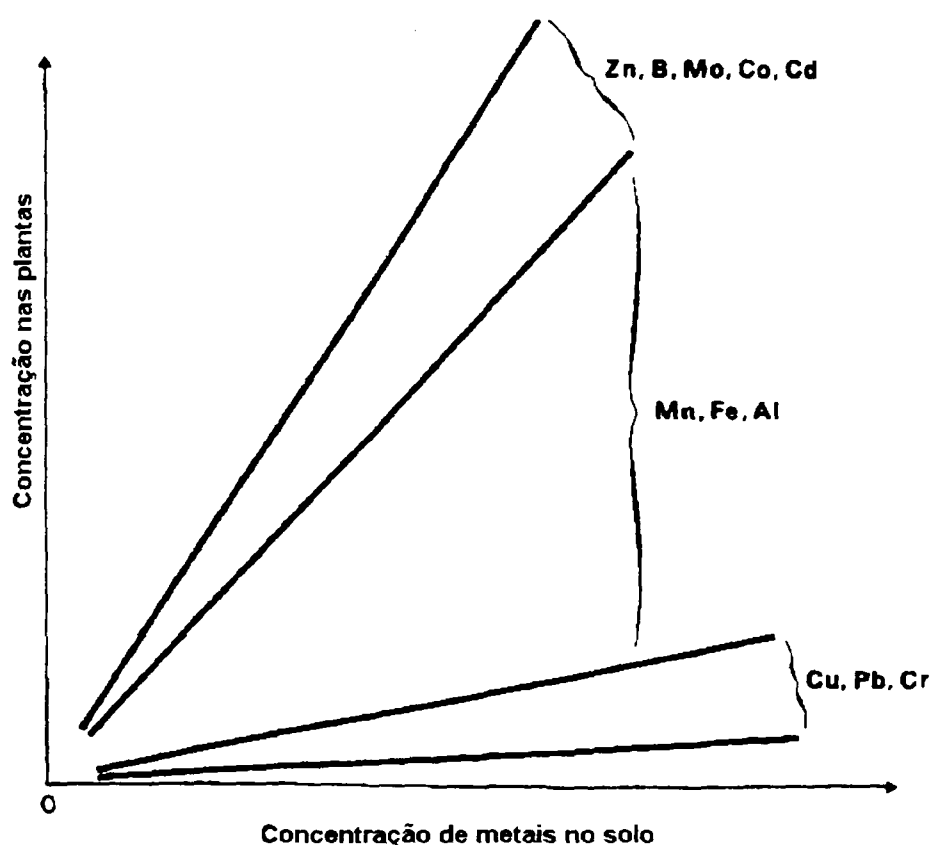
Outro aspecto importante a ser considerado é a interação entre os diversos metais e não metais, que podem resultar numa potencialização ou diminuição dos seus efeitos deletérios (DIVE et al., 1989; DIVE et al., 1983; DIVE et al., 1988; SPRAGUE & RAMSAY, 1965), além da interação com as substâncias húmicas, que acabam complexando alguns metais (DIVE et al., 1982).

Embora existam vários estudos que comprovem a eficácia do lodo biológico no aumento da produção agrícola, estes consideram somente o período inicial de aplicação (GILLIES et al., 1989; GUIDI et al., 1990), e enquanto que os estudos que visam a avaliação a longo prazo, destacam o cuidado com a migração dos metais e o seu acúmulo no solo (GRUNEKLEE et al., 1989; HIEROLD, 1990; LANGENOHL, 1991; LEVINE et al., 1989; LIN, 1989; LINSTER & YOUNG, 1991; SMILDE, 1989; SRIKANTH & REDDY, 1991; STAHR, 1989).

GRUN & PUSCH, (1989), destacaram em seu estudo de avaliação da aplicação de lodos com metais pesados ao longo de vários anos, que a principal alteração observada se dava nas

raízes das plantas, que apresentavam maior acumulação. HASSELBACH et al., (1990) e SHRIVASTAVA & SINGH, 1989 também reforçam este dado em seus estudo onde envolveu várias culturas, e mostrou que a cenoura, comparada com outros tubérculos, foi a que mais acumulou metais no seu desenvolvimento.

FIGURA 1 - CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NOS SOLOS, E AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES NAS PLANTA (ALLOWAY, 1990)



Os metais pesados também mostraram ter efeito deletério na população de rizóbios do solo (HIRSCH et al., 1993), e micorrizas (KOOMEN & McGRATH, 1990; LAMBERT & WEIDENSAUL, 1991)

Não existem até o momento tecnologias viáveis de descontaminação de lodos biológicos quanto à metais pesados, pois dos métodos analisados até hoje, todos esbarram na limitação econômica.

Já foram sugeridos vários métodos de solubilização de metais pesados de lodos biológicos (TYAGI et al., 1988) e dentre eles podemos citar os estudos de métodos de extração de metais pesados através do uso de EDTA, um forte quelante, e que mostrou altas taxas de remoção de Cd, Pb e Cu (JENKINS et al., 1981², citados por TYAGI et al., 1988).

Apesar da boa lixiviação de metais alcançada com outro método (tratamento ácido), fatores como custo, dificuldades operacionais, grandes quantidades de ácido (0.5 à 0.89 g de H₂SO₄ g⁻¹ do peso seco do lodo) e grande quantidade de cal necessário no final do tratamento, tem feito que as aplicações práticas destes métodos não se concretizem.

Este trabalho visa estudar o processo de biolixiviação de metais pesados, estudo este iniciado por SCHONBORN & HARTMANN, (1978) e continuados em Quebec - Canadá por TYAGI et al. (1988).

Para que fosse possível o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas metodologias estabelecidas da Química, Microbiologia, Biohidrometalurgia e Engenharia Sanitária.

Visando a estruturação do trabalho, quatro áreas foram estudadas:

- a) Tratamento de efluentes
- b) Microbiologia de lodos
- c) Biohidrometalurgia
- d) Química dos metais pesados

Como não são áreas totalmente isoladas, sempre haverá situações onde esta distinção não será muito clara. Nestas situações estaremos na interface destas áreas, que se interagem dinamicamente. Como imaginar o sanitarismo sem o envolvimento da microbiologia ? Química e Biohidrometalurgia ? E assim por diante ?

Após estas quatro primeiras seções, correspondentes as quatro áreas mencionadas, as que se seguem tratarão mais especificamente destas situações-interface.

2.1 TRATAMENTO DE EFLUENTES

2.1.1 COMPOSIÇÃO DO LODO DE ESGOTO DOMÉSTICO

² JENKINS, R.L.; BENJAMIN, J.S.; MARVIN, L.S.; RODGER, B.; LO, M.P.; HUANG, R.T. Metals removal and recovery from municipal sludge; J. Water Pollut. Control Fed. 53(1), 25-23. 1981

A quantidade mínima de água de esgoto produzida por pessoa (per capita) é de 4 litros por dia. Nos países tecnologicamente mais avançados, onde a oferta de eletrodomésticos a nível doméstico como de processos e equipamentos a nível industrial, faz com que esta quantidade tenha aumentado consideravelmente. O uso de banheiras, chuveiros, máquinas de lavagem automática, lavadoras de louça, e unidades de disposição de lixo produzem grandes quantidades de água suja diluída com baixo conteúdo de sólidos, e todos necessitando tratamento antes de serem liberados para os rios. Por exemplo, um vaso sanitário dilui pequenos volumes de resíduos (< que 1 litro) para aproximadamente 10 ou 30 litros à cada vez que é usado. O esgoto doméstico é tão diluído que é composto essencialmente de 99,9% de água com um conteúdo de matéria sólida seca de aproximadamente menos que 0,1%. O tratamento convencional do esgoto visa converter os sólidos em suspensão e dissolvidos em um lodo manuseável (2% de sólido secos) enquanto deixa somente uma pequena proporção no efluente líquido final (0,003% de sólidos secos).

Em uma casa, a água de esgoto vem de 3 fontes principais:

- 1/3 do volume vem do banheiro (vaso sanitário e lavatório);
- 1/3 do banho com chuveiro;
- 1/3 de outras fontes, como lavagem de louça, roupas e preparação de alimentos e bebidas.

2.1.1.1 Composição do esgoto

O esgoto é classificado como doméstico ou industrial. Doméstico quando vem exclusivamente de residências, construções comerciais, e instituições como escolas e hospitais, enquanto que o esgoto industrial vem de fábricas. Inevitavelmente, as grandes cidades tem uma mistura destes dois tipos de esgoto, que é comumente referido como esgoto municipal, e normalmente inclui efluentes de indústrias, como lavanderias, padarias, assim como uma variedade de pequenas fábricas. É pouco comum para estações de tratamento de esgoto aceitarem esgoto de grandes complexos industriais, tais como manufatura de produtos químicos, cervejaria, frigoríficos, metalúrgicas ou fábricas de papel, a menos que a estação de tratamento esteja equipada para isso. A prática para autoridades dos países europeus é que a própria empresa faça o tratamento e disposição do seu esgoto com estações especialmente planejadas para tal.

O esgoto é uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos com uma pequena proporção de substâncias sintetizadas pelo homem. A principal fonte de poluição no esgoto são as excreções humanas com pequenas contribuições de resíduos da preparação da comida, higiene pessoal, lavagem de roupas e drenagem de superfícies. A natureza físico-química das águas do esgoto municipal pode se tornar mais complexa pelo despejo de resíduos industriais.

As principais análises realizadas para se avaliar a tratabilidade de um esgoto são: DBO_5 , sólidos em suspensão e amônia, pois são estes os determinantes básicos, pela qual a "força poluente", é avaliada.

A concentração de nitrogênio na água de esgoto doméstico é diretamente relacionado à DBO_5 , com aproximadamente 40% do nitrogênio total em solução na forma de amônia. As proteínas e a uréia originam a desaminação liberando amônia à medida que a água flui para a estação de tratamento. Quanto mais tempo o esgoto permanece na rede coletora, maior é a liberação de amônia. A produção de nitrogênio per capita no Reino Unido é de 5.9 g N por dia (PAINTER, 1958), que é essencialmente a mesma nos EUA (BABBITT, 1947). A produção per capita de fósforo é de aproximadamente um terço do peso do Nitrogênio produzido - aproximadamente 1,4 kg per capita por ano. Destes, 70% vem dos polifosfatos utilizados em detergentes sintéticos

O esgoto só pode ser tratado biologicamente se concentrações adequadas de nitrogênio e fósforo estiverem presentes. Normalmente existe um excesso destes nutrientes no esgoto para as necessidades biológicas, mas é necessário avaliar a tratabilidade do esgoto checando a relação de carbono para nitrogênio e fósforo (C:N:P). A relação ótima de C:N:P para tratamentos biológicos é 100:5:1 mg l^{-1} . A necessidade de nitrogênio pelos microrganismos na unidade biológica de uma estação de tratamento é satisfeita se a relação de carbono, medida como DBO , para nitrogênio é igual ou menor que 18:1. Até à relações C:N maiores que 22:1 a remoção ainda ocorre, mas com sua eficiência reduzida.

Os microrganismos requerem níveis inferiores de fósforo, se comparados com os níveis necessários de nitrogênio. A relação exata de C:N:P para que ocorra o crescimento microbiano ótimo depende do processo biológico e a forma na qual os nutrientes estejam disponíveis no esgoto. Onde há desequilíbrio na relação ótima de C:N:P do esgoto, é necessário que se faça a adição de

nutrientes para garantir que a oxidação biológica ocorra. Isto geralmente é feito misturando-se esgoto deficiente com esgoto não deficiente nas proporções corretas. Esgotos de indústrias de fermentação e enlatados são particularmente deficientes em nitrogênio e fósforo, assim é necessária a complementação de nutrientes para que a oxidação carbonácea ótima seja alcançada.

2.1.1.1.1 Propriedades orgânicas

A matéria orgânica compreende as substâncias compostas pelos elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo. No esgoto típico 75% dos sólidos em suspensão e 40% dos sólidos filtráveis são orgânicos. PAINTER (1983) estimou que no esgoto 50% do carbono orgânico e aproximadamente 35-50% do nitrogênio orgânico estejam em solução. 75% do carbono orgânico são atribuídos aos principais grupos orgânicos de carboidratos, gorduras, proteínas, aminoácidos e ácidos voláteis. O restante compreende outras moléculas orgânicas, tais como: ácidos nucleicos, hormônios, vitaminas, surfactantes, antibióticos, contraceptivos hormonais, pesticidas, hidrocarbonetos e pigmentos. Várias das moléculas sintéticas orgânicas não são biodegradáveis, enquanto outras são decompostas lentamente por ação biológica. Os constituintes orgânicos dos sólidos em suspensão e a fração filtrável do esgoto são muito diferentes. Os carboidratos compreendem o maior grupo no esgoto britânico, seguido dos ácidos voláteis e não voláteis, aminoácidos ligados e livres e detergentes aniônicos. A uréia é o principal componente da urina, mas é hidrolisada tão rapidamente à amônia, que é encontrada somente no esgoto recente. A composição do esgoto muda rapidamente durante o armazenamento, devido à ação das bactérias anaeróbias, por exemplo, os carboidratos são rapidamente convertidos à ácidos voláteis. As gorduras são os principais constituintes orgânicos que compõem a espuma, e juntamente com os carboidratos e proteínas contribuem para 60-80% do carbono orgânico presente.

As gorduras estão entre os compostos orgânicos mais estáveis e não são facilmente degradadas biologicamente. A principal fonte de gorduras vem da preparação de alimentos e em menor escala das excreções, sendo as principais fontes: a manteiga, margarina, toucinho, banhas, gorduras vegetais, óleos, carne, cereais, nozes e certas frutas. As gorduras são pouco solúveis em água e desta forma são um componente importante da fração em suspensão do esgoto,

contribuindo com cerca de 50% do carbono total presente. A concentração normal é bastante variável nos esgotos domésticos, indo de 40 a 100 mg l⁻¹.

O ácido acético é o principal ácido volátil encontrado no esgoto, sendo registrado em concentrações entre 6-37 mg l⁻¹ e, juntamente com os ácidos propiônico, butírico, e valérico, constituem cerca de 90% do total da acidez volátil no esgoto.

As proteínas são uma fonte comparativamente importante de carbono no esgoto, no entanto elas são menos importantes que os carboidratos solúveis ou gorduras. A proteína é o principal constituinte de todos os animais, e em menor extensão, do tecido vegetal. Assim, os resíduos da preparação de alimentos e excreções são ricas em proteínas como a caseína do leite, albúmen e gelatina do tecido animal e ossos. Além de conterem carbono, hidrogênio e oxigênio, as proteínas também contêm uma proporção alta de nitrogênio. A uréia é a principal fonte de nitrogênio no esgoto e corresponde a mais de 80% do nitrogênio orgânico total presente. As proteínas são constituídas de longas cadeias de aminoácidos ligados por ligações peptídicas e são facilmente quebradas por ação bacteriana para a formação de aminoácidos livres, ácidos graxos, compostos nitrogenados, fosfatos e sulfetos. No esgoto, os aminoácidos livres geralmente contribuem com menos de 5 mg N l⁻¹.

Além dos aminoácidos, a uréia é também uma fonte de nitrogênio no esgoto, provendo entre 2-16 mg N l⁻¹. A uréia é mais abundante no esgoto recente, pois é rapidamente convertida para amônia. A taxa de conversão para amônia tem sido estimada à 3 mg N l⁻¹ por hora à 12°C em amostras armazenadas (PAINTER, 1958).

Nem toda a matéria orgânica biodegradável encontrada no esgoto pode ser classificada dentro de qualquer uma das principais categorias de compostos químicos. Alguns componentes naturais são de fato combinações de carboidratos, proteínas e gorduras como as lipoproteínas e nucleoproteínas. A fração de material não biodegradável é normalmente muito pequena. Frações como as ligninas e a celulose são degradadas muito superficialmente, devido ao tempo limitado para a decomposição dentro da estação de tratamento, e porque vários organismos específicos para esta decomposição não estão presentes no esgoto.

A fração orgânica do lodo exerce papel importante na especiação da fração inorgânica, principalmente através dos polímeros bacterianos extracelulares e dos ácidos fúlvicos (KARAPANAGIOTIS et al., 1990)

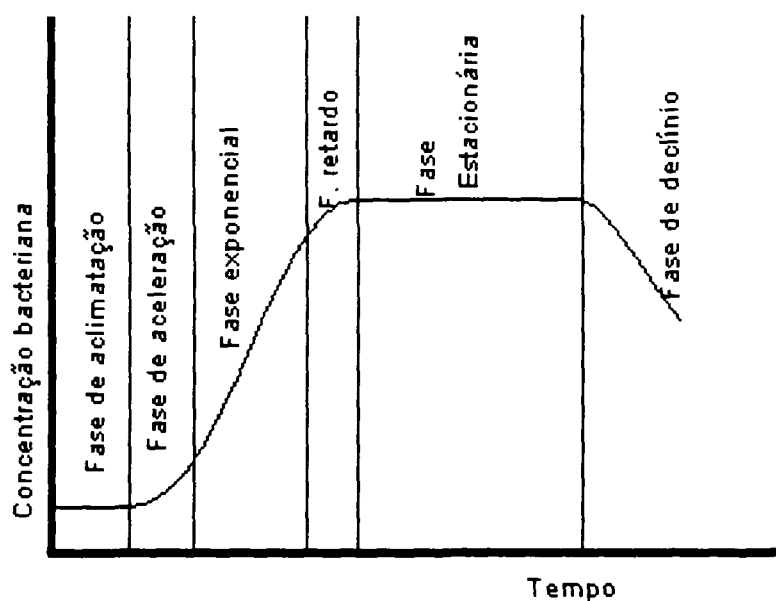
2.2 MICROBIOLOGIA DE LODOS

2.2.1 MICRORGANISMOS E O CONTROLE DA POLUIÇÃO

Para que o tratamento de esgotos, baseado em lodos ativados tenha sucesso, é de fundamental importância que ocorra a formação de flocos constituídos principalmente de bactérias filamentosas, que dão estrutura, e de pequenos agregados das demais bactérias. A teoria da formação destes flocos é de extrema importância para o bom entendimento de como funciona este tratamento.

Através do crescimento de microrganismos em culturas puras, MONOD (1941) estabeleceu um modelo de curva de crescimento, reproduzida na FIGURA 2, e que apresenta as seguintes fases:

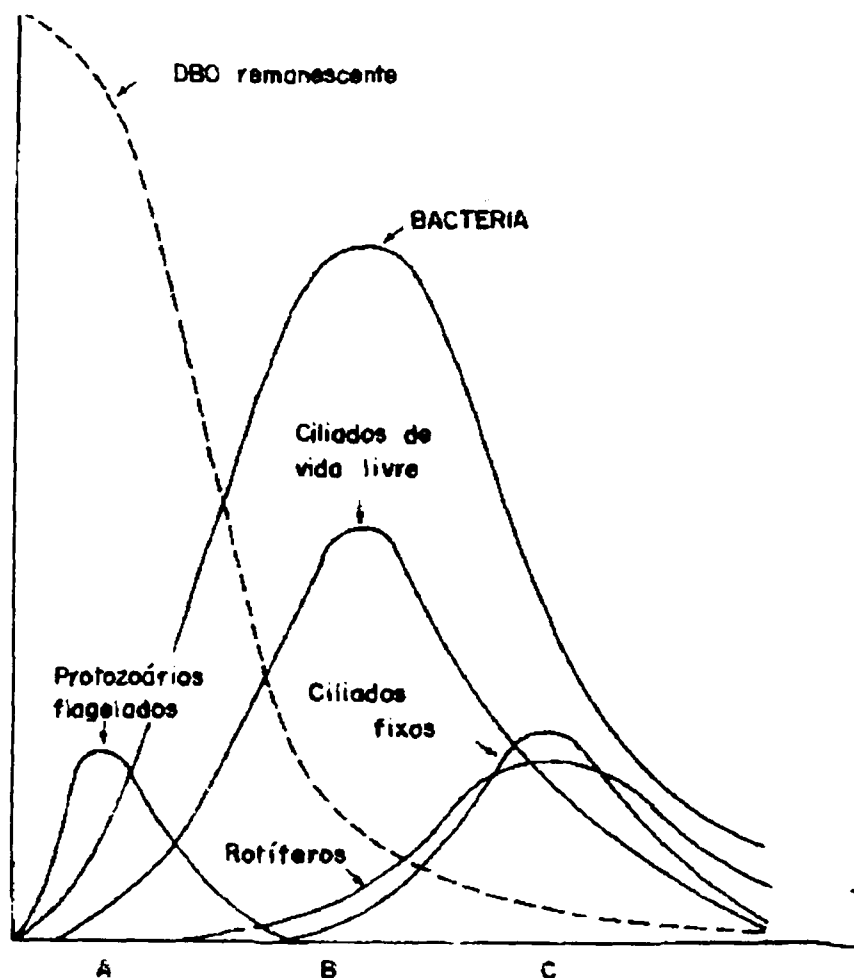
FIGURA 2 - MODELO DE CURVA DE CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS EM CULTURA PURA (CETESB, 1992)



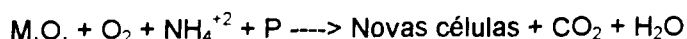
- a) Lag, ou de aclimação: não ocorre aumento do número de microrganismos, na medida em que, nesta etapa, eles elaboram o arsenal enzimático necessário ao consumo dos substratos. A velocidade de crescimento é nula;
- b) Aceleração: inicia-se o crescimento microbiano, face ao consumo de substrato. A velocidade de crescimento aumenta com o tempo;
- c) Log, ou Exponencial: frente às condições adequadas de vida (Substrato abundante, baixa concentração de metabólitos tóxicos etc.), o microrganismo cresce com velocidade máxima, que pode ser representada por uma função exponencial;
- d) Desaceleração: a velocidade de crescimento, que era máxima na fase anterior, passa a diminuir, uma vez que o substrato disponível começa a escassear e já existe o acúmulo ponderável de excretas tóxicas;
- e) Estacionária: A velocidade de crescimento dos microrganismos volta a ser nula, devido ao esgotamento dos substratos ou ao acúmulo de substâncias tóxicas em níveis incompatíveis com o desenvolvimento microbiano;
- f) Declínio: ocorre a diminuição do número de microrganismos (velocidade de crescimento negativa) causada pela sua morte ou lise.

Nas duas últimas fases os microrganismos consomem suas reservas (metabolismo endógeno), e a energia livre na forma de compostos orgânicos metabolizáveis fica sensivelmente diminuída, desta forma os microrganismos não tem mais condições de evitar a força das cargas opostas, que tende à agrega-los e consequentemente forma-se o floco. Portanto, os flocos ocorrem principalmente no final da fase exponencial e começo da fase de retardo. E o manejo da estação de tratamento biológico deve ser sempre no sentido de manter o processo nesta região (CETESB, 1992). A sucessão ecológica dos microrganismos ao longo do tempo já está bem estabelecida, e pode ser observada na FIGURA 3.

FIGURA 3 - SUCESSÃO ECOLÓGICA DE ORGANISMOS EM LODOS ATIVADOS



A reação total de tratamento biológico do esgoto pode ser sumarizada como :



Onde: M.O. : Matéria orgânica

2.2.2 DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA

A água de esgoto industrial raramente contém patógenos, mas quando presentes, estão diretamente relacionados à matéria-prima vegetal ou animal que está sendo processada. Por exemplo, no caso da industrialização da batata, o efluente pode conter patógenos vegetais específicos destas.

Os patógenos do esgoto são capazes de infectar o homem e os animais por ingestão oral, pele ou pelas vias respiratórias. A via de infecção mais comum é a oral, que geralmente causa distúrbios gastro-intestinais. O patógeno multiplica-se e é excretado com as fezes e subsequentemente ingerido pelo próximo hospedeiro via contaminação pelo esgoto, água ou alimento.

2.2.2.1 Os patógenos originários da água

Os mais importantes em termos de frequência de isolamento em água contaminada de esgoto, ou lodo são as espécies do gênero *Salmonella*, *Shigella*, *Leptospira*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Francisella*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, vírus entéricos humanos, cistos de *Entamoeba histolytica*, ou outros protozoários patogênicos e larvas de vários vermes. Todos estes organismos são bem caracterizados e tem sido amplamente revistos. No entanto somente um breve resumo dos principais microrganismos é dado a seguir:

2.2.2.2 Organismos indicadores

A maioria dos países requer por lei que a água potável seja regularmente examinada para assegurar que esteja livre de organismos que causem doenças. No entanto, os padrões aceitáveis variam de país para país. A grande diversidade de microrganismos patogênicos encontrados em

águas de esgoto estão normalmente presentes em números baixos comparados com outros organismos não patógenos que também estão presentes. O isolamento e identificação de organismos patogênicos individuais é geralmente complexa, sendo diferente para cada espécie e com um gasto de tempo grande. Assim, torna-se impossível examinar todas as amostras de água de forma rotineira para a presença ou ausência de tamanha variedade. Além disso, a seleção de patógenos individuais pode ser errônea na medida que cada espécie pode tolerar condições ambientais diferentes e a presença de um pode não indicar a presença de outro. Assim para examinar amostras rotineiras de água um único teste, preferencialmente rápido é necessário. É mais importante examinar uma amostra de água freqüentemente por um teste simples, que ocasionalmente por uma série de testes mais complicados. Isto levou ao desenvolvimento do conceito do uso de organismos indicadores para verificar a probabilidade de contaminação por fezes. Os critérios para seleção de organismos indicadores são:

- a) Estejam presentes toda vez que os patógenos estiverem presentes e em número muito maior;
- b) Devem ser consistentemente e exclusivamente associados com a fonte dos patógenos;
- c) Devem ser resistentes ou até mais resistentes à desinfetantes, sistemas de tratamento e ao ambiente aquoso que os organismos patogênicos;
- d) Serem adequados para isolamento de rotina por crescerem em meios de cultura seletivos, além de serem facilmente identificáveis e contados com acurácia e precisão boa.

Os organismos não patogênicos que estão sempre presentes no intestino do homem e animais são excretados juntamente com os patógenos, mas em números muito maiores, vários deles são facilmente isolados e são ideais como indicadores de contaminação fecal. As mais amplamente utilizadas são as bactérias não-patogênicas, em particular os coliformes, estreptococos fecais, e *Clostridium perfringens*. Existe um grande interesse em outros organismos indicadores e a habilidade de detectar rapidamente concentrações baixas de compostos associados às fezes, que não são afetadas por fatores ambientais. Isto coloca o uso dos organismos indicadores para testes de água para contaminação fecal sob revisão.

Três grupos são normalmente usados para indicar contaminação fecal *Escherichia coli* ou coliforme fecal, estreptococos fecais e *Clostridium perfringens*. Os três grupos são capazes de sobreviver por diferentes períodos de tempo no ambiente aquático. Os estreptococos fecais morrem mais rapidamente fora do hospedeiro, e sua presença é uma indicação de contaminação recente. *E. coli* pode sobreviver por várias semanas sob condições ideais e são detectadas mais facilmente que outras bactérias indicadoras. Por causa disso, é o teste mais utilizado para detectar poluição fecal. *Clostridium perfringens* é um anaeróbio esporulador que pode existir indefinidamente na água. Quando *E. coli* e os estreptococos fecais estiverem ausentes, sua presença indica poluição remota ou intermitente. É especialmente útil para testar água de lagos, no entanto os esporos se decantam em suspensão. Os esporos são mais resistentes à poluição industrial que os outros indicadores e são especialmente úteis em águas que recebem tanto esgoto doméstico e água de esgoto industrial.

Para proteger com sucesso os reservatórios de água, especialmente aqueles em áreas rurais, é necessário ser capaz de rastrear a fonte da poluição fecal. As técnicas bacteriológicas tradicionalmente usadas falham em distinguir entre a poluição fecal humana e animal. Existem várias modificações nos métodos tradicionais disponíveis como estimar-se a relação de coliformes fecais com estreptococos fecais ou as relações de tipos diferentes de estreptococos. No entanto o uso de bactérias indicadoras específicas são talvez as mais promissoras.

2.2.2.3 *Escherichia coli* e os coliformes

O grupo coliforme incluem as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, gram negativas, não formadoras de esporos que fermentam a lactose, formando ácido e gás no período de 48 horas quando incubadas à 35°C (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Microscopicamente, todas as espécies de Enterobacteriaceae aparentam-se como bastonetes entre 2-3 x 0.5 µm, e são impossíveis de se distinguir por exame visual. Somente *E. coli* é exclusivamente de origem fecal, estando presente em fezes recentes em número maior que 10⁸ ufc g⁻¹, enquanto que os outros coliformes são habitantes normais do solo e água. Assim a presença de coliformes não implica necessariamente em contaminação fecal até que se prove o contrário.

2.2.2.4 Streptococos fecais

Os estreptococos que ocorrem normalmente em fezes animais e humanas são do grupo *enterococcus* que incluem: *S. faecalis* (inclusive a variedade *liquefaciens* e *Zymogenes*), *S. faecium*, *S. durans*, e do grupo *viridans* que compreende *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. bovis* e *S. equinus*, todos eles encontrados comumente em águas contaminadas. *S. Bovis* e *S. equinus* não são encontrados no homem e podem ser utilizados como indicadores de restos animais ou de águas de esgoto provenientes de processamento de carnes. No entanto, por todas estas espécies serem indicativas de poluição fecal, não é necessário identificá-las individualmente. Um único teste para todo o grupo é suficiente.

Os estreptococos fecais são cocos gram positivos de aproximadamente 1µm de diâmetro que ocorrem em cadeias de vários tamanhos, não são móveis e não esporulam. Numericamente podem ser iguais ou mais abundantes que os coliformes.

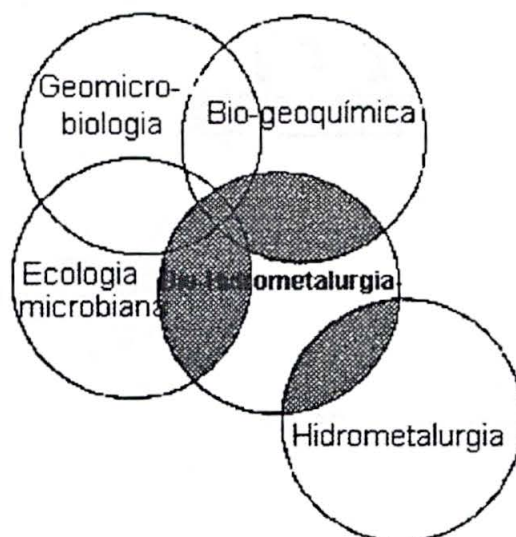
2.2.2.5 Relação de coliformes fecais / estreptococos fecais

Diferentes animais excretam quantidades diferentes de coliformes fecais e estreptococos fecais, e esta relação permanece constante para fontes específicas. Assim a relação de coliformes fecais (FC) para estreptococos fecais (FS) pode ser usada para identificar a fonte de contaminação fecal em corpos de água. A relação FC/CS em fezes recentes humanas é > 4 enquanto que para animais é < 0.6 . Valores intermediários são difíceis de se interpretar, mas valores entre 2.0 e 4.0 indicam predominância de resíduos humanos em poluição mista, enquanto que 1.0 - 2.0 indicam níveis iguais de poluição animal e humana, e 0.7-1.0 uma predominância de resíduos animais. A relação é especificamente útil no rastreamento de fontes de poluição e relações > 4.0 ou < 0.6 alertam do perigo em particular de transmissão de doenças humanas ou animais respectivamente. No entanto deve-se tomar cuidado na utilização desta relação. Por exemplo, a variabilidade entre as amostras pode ser significativa, fazendo com que as repetições sejam vitais. Tanto os estreptococos como os coliformes são mortos à pH extremos, assim como com os poluentes industriais. Deve-se tomar cuidado também para se assegurar que as amostras estejam livres de contaminantes e que o pH esteja entre 4-9. A taxa de morte dos 2 grupos de microrganismos variam, logo a relação FC/FS se altera significativamente, se os microrganismos forem liberados no ambiente há mais que 24 horas. Isto pode ser evitado tomando-se as amostras perto da fonte poluidora suspeita e analisar-se as amostras rapidamente.

2.3 BIOHIDROMETALURGIA

A Biohidrometalurgia é o resultado da interação de várias outras áreas da ciência, e pode ser definida como "Processo de dissolução de rochas, concentrados produzidos por métodos minerais metalúrgicos ou componentes de produtos metalúrgicos, catalisado por microrganismos adequados (ROSSI, 1990), se situando entre a geomicrobiologia, ecologia microbiana, hidrometalurgia, e a biogeoquímica microbiana (FIGURA 4).

FIGURA 4 - DIAGRAMA DE VENN-EULER MOSTRANDO AS INTERAÇÕES ENTRE AS VÁRIAS CIÊNCIAS RELACIONADAS À MICROBIOLOGIA E A BIOHIDROMETALURGIA (ROSSI, 1990)



A extração de metais à partir de minérios com baixa concentração é uma das principais aplicações da biohidrometalurgia. Geralmente este minério com baixa concentração é obtido à partir do processo pirometalúrgico tradicional, no qual se extrai o metal desejado, restando contudo, resíduos consideráveis, mas não economicamente viáveis de retomarem novamente ao início do processo (HUTCHINS et al., 1986; TORMA, 1986). É neste ponto que a biohidrometalurgia tem sua maior aplicabilidade, e dentro desta, a ação da bactéria *Thiobacillus ferrooxidans* tem papel fundamental. Devido ao seu baixo custo de operação, se torna economicamente viável sua aplicação para um maior aproveitamento do minério (ROSSI, 1990).

2.3.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA BIOLIXIVIAÇÃO

Os dois microrganismos mais utilizados na lixiviação bacteriana são o *Thiobacillus thiooxidans* e o *Thiobacillus ferrooxidans*. Vários outros podem ser também usados : *Thiobacillus concretivorus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Achromobacter*, *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. luteus*, *B. polymyxa*, *B. megaterium*, e várias bactérias termofílicas, incluindo *Thiobacillus thermophilica*, *Thermothrix thioparus*, *Thiobacillus TH1*, e *Sulfobolus acidocaldarius*. Os

organismos heterotróficos listados acima não foram usados ainda, mas é provável que no futuro processos sejam desenvolvidos no sentido que os metais sejam extraídos dos minérios pela ação dos ácidos orgânicos produzidos microbiologicamente via quelatos e formação de sais. Por causa do seu crescimento mais rápido, as bactérias termofílicas podem acelerar significativamente o processo de lixiviação (EHRlich, 1990)

2.3.2 PROCESSOS COMERCIAIS

Três métodos tem aplicações práticas:

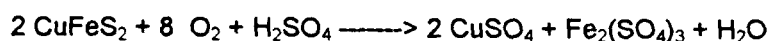
- Lixiviação em curva (Slope leaching): Minérios moídos são colocados em grandes pilhas ao lado de um barranco e continuamente irrigados com água contendo *Thiobacillus*. O líquido é coletado na base e reutilizado após a extração dos metais, e é possível o enriquecimento da bactéria na lagoa de oxidação.

- Lixiviação em pilhas. O minério é arranjado em grandes pilhas e tratado como no "slope leaching".

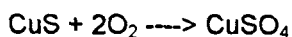
- Lixiviação *In Situ*: O líquido contendo *Thiobacillus* é bombeado através de passagens perfuradas no minério bruto (. Na maioria dos casos, a permeabilidade da rocha deve ser aumentada explodindo-a). O líquido ácido passa através da rocha e é coletado na cavidade inferior , sendo então bombeado para cima, onde ocorre sua extração. O líquido é reutilizado após novo enriquecimento regeneração da bactéria.

2.3.3 LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE COBRE

Vários minérios são utilizados na produção de cobre, e vários metais são encontrados associados. Por exemplo, a calcopirita (CuFeS_2) contém 25% de cobre, 25,9% de ferro, 2,5% de zinco, e 33% de enxofre. A calcopirita é oxidada da seguinte forma:



A covelita (CuS) é oxidada à sulfato de cobre:



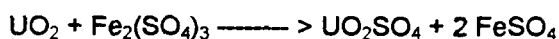
O sistema de biolixiviação de cobre tem sido utilizado em grande escala no mundo inteiro, já há vários anos, geralmente operados pelo método de lixiviação em pilhas (slope leaching), e em algumas vezes como uma combinação de pilha e lixiviação *in situ*. A solução lixiviadora (solução de sulfato e Fe^{3+}) é irrigada sobre a pilha e percola através da rocha para o nível inferior onde o líquido rico em cobre é coletado. A solução de cobre (contendo acima de 0,6 g/l) é removida, o cobre é precipitado, e a água é reutilizada após o ajuste do pH para 2.

Os países no qual a lixiviação microbiana do cobre tem sido muito utilizada incluem Estados Unidos, Austrália e Japão. Atualmente 25% da produção mundial de cobre provém de processos de biolixiviação, representando anualmente cerca de 1 bilhão de dólares. No Brasil a biolixiviação do cobre já vem sendo estudada em várias localidades, tais como Jaguari - BA (FIGUEIREDO et al., 1994); Caraíba - BA (URENHA & ALLI, 1990); Camaquã - RS (VAISBICH et al., 1979)

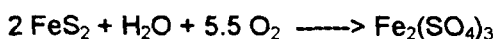
2.3.4 LIXIVIAÇÃO DE MINÉRIOS DE URÂNIO

Embora a quantidade de urânio obtida por biolixiviação seja menor que a de cobre, o processo é economicamente mais significativo devido ao preço relativamente alto do urânio, centenas de toneladas do material devem ser manipuladas para obter uma tonelada de urânio, e a lixiviação *in situ* está ganhando cada vez mais, maior aceitação, pois elimina os gastos com o transporte de grandes quantidades de minério.

No processo de lixiviação do urânio, o óxido de urânio tetravalente insolúvel é oxidado com uma solução a quente de ácido sulfúrico e Fe^{3+} para formar o sulfato de urânio (UO_2^{2+}) solúvel.



O sulfato férrico e o ácido sulfúrico podem ser produzidos pelo *T. ferrooxidans* a partir da metabolização da pirita (FeS_2) contida dentro do minério de urânio.



A reação da pirita é usada para a produção inicial da solução lixiviadora de Fe^{3+} .

As condições ótimas de lixiviação do minério de urânio são: pH 1.5-3.5, 35°C e 0.2% $\text{C}\Phi_2$ no ar. Algumas linhagens termofílicas são conhecidas e que tem uma temperatura ótima de 45-50°C (EHRlich, 1990).

Em processos comerciais, o urânio dissolvido é extraído do líquido lixiviado com solventes orgânicos como o tributilfosfato, e o urânio é precipitado subsequente da fase orgânica. A adsorção dos íons uranila com trocadores de íons é outra possibilidade. Os solventes orgânicos que permanecem no sistema após a extração podem ser tóxicos e consequentemente causar problemas quando o sistema microbiológico é reutilizado.

No Brasil a biolixiviação dos minérios de urânio já foi estudada em Poços de Caldas pela antiga Empresas Nucleares Brasileiras - NUCLEBRÁS, atualmente Urânio do Brasil S/A (GARCIA, 1993)

2.4 METAIS PESADOS

2.4.1 DEFINIÇÃO DE METAIS PESADOS

Embora amplamente utilizado, o termo "metal pesado", não possui uma definição única, variando de acordo com o ramo da ciência que o aborda. Ao questionarmos um toxicologista sobre esta definição, este provavelmente dará ênfase aos elementos químicos tóxicos aos mamíferos superiores (zootoxicidade). Ao agrônomo, ênfase será dada principalmente aos elementos químicos tóxicos às culturas vegetais (fitotoxicidade), cuja contaminação no solo possa diminuir a produtividade agrícola. Um químico poderá enfatizar os elementos cuja densidade atômica seja maior que 6g cm^{-3} . A idéia comum de metais pesados à estas diversas áreas é a de serem metais ou metalóides que estão associados com poluição e toxicidade, mas também incluem alguns elementos que são essenciais para os seres vivos em baixas concentrações. "Metais tóxicos" é uma alternativa ao termo metais pesados, mas é mais emotivo e aplicável somente aos elementos não essenciais, como Pb, Cd, Hg, As, Tl e U e não é apropriado para os elementos que são biologicamente essenciais como Co, Cu Mn, Se e Zn (ALLOWAY, 1993).

2.4.1.1 Cádmio

Conforme ALLOWAY (1993), O cádmio é uma descoberta relativamente recente, tendo sido descrito e descoberto em 1817, está em 67º lugar na ordem de abundância de elementos. Não possui função biológica e é altamente tóxico à plantas e animais, no entanto os níveis naturais de Cd encontrados normalmente não causam toxicidade aguda. O maior risco à saúde humana provém da sua acumulação crônica nos rins, onde podem causar disfunção no córtex em concentrações acima de 200 mg/kg do peso fresco. Os alimentos são a principal via pela qual o Cd entra no corpo, mas o fumo e as exposições ocupacionais aos vapores de CdO também são fontes importantes de contaminação.

A FAO/WHO recomenda que nível de ingestão máxima tolerável seja de 400 a 500 µg/semana, o que é equivalente à aproximadamente 70µg por dia. A ingestão média mundial de Cd varia entre 20 - 75µ /dia e aparecem problemas claramente visíveis quando a ingestão se aproxima do topo da variação. Os fumantes adicionam uma dose extra de 20 à 35 µg Cd /dia à sua ingestão. O Cádmio é um dos metais pesados mais preocupantes, principalmente devido à fácil absorção deste pelas plantas, acumulando-se à medida que sobe na cadeia trófica (GILLER & McGRATH, 1989)

Em vista dos danos da acumulação crônica do Cd no corpo humano, os fatores que influenciam sua concentração nos componentes da dieta são de grande importância. Como geralmente as concentrações deste metal nos solos não contaminados é baixa, as fontes de contaminação e o comportamento deste elemento nos solos contaminados são de grande interesse. Com a vida-média estimada do Cd varia entre 15 - 1100 anos, torna-se este um problema de longo prazo, demonstrando que sua poluição deve ser prevenida ou minimizada ao máximo.

Como resultado da necessidade crescente do Cd pela indústria, a poluição ambiental deste elemento tem aumentando rapidamente nas últimas décadas. A poluição é uma consequência inevitável da atividade de mineração, manufatura e descarte. Ao contrário do Pb, Cu e Hg que tem sido utilizados à séculos, o Cd tem sido usado em grande escala somente neste século (mais da metade do Cd utilizado até hoje na indústria foi produzido nos últimos 20 anos). É obtido como um co-produto da fundição do Zn e outros metais-base. Nenhum mineral é usado primariamente como fonte de Cd. A produção aumentou de 11.000 t em 1960 para 19.000 t em 1985. Seus usos

principais são como: (1) revestimento protetor no aço; (2) várias ligas; (3) em pigmentos para plásticos e vidros; (4) como estabilizantes para plásticos; (5) em baterias secas de Ni-Cd, e (6) outros usos diversos, incluindo células fotovoltaicas.

As fontes de contaminação do solo pelo Cd são a mineração e fusão do Cd e Zn; poluição atmosférica de indústrias metalúrgicas; disposição de lixo contendo Cd, como a incineração de containers plásticos e baterias, uso de lodos de esgoto em solos; e a queima de combustíveis fósseis. Mesmo antes do Cd ser usado comercialmente, a contaminação ocorria vindo de uma grande variedade de materiais que continham Cd como impureza, e os fertilizantes fosfáticos são um bom exemplo. Embora a concentração de Cd nestes fertilizantes variasse bastante o seu uso contínuo leva a aumentos significativos no nível de Cd de vários solos agrícolas. A deposição de partículas de aerossol da poluição atmosférica de grandes centros urbanos e industriais também afeta os solos da maioria dos países industrializados, e o Cd desta fonte pode ser absorvido também pelas plantas através da folhagem.

2.4.1.1.1 Origem do cádmio nos solos

A degradação de rochas é uma das principais fontes de cádmio em solos. (PAGE & BINGHAM (1973) citado por ALLOWAY, 1993 sugeriram que os solos derivados de rochas ígneas deveriam ter concentrações de Cd entre 0.1 - 0.3 mg/kg, os solos derivados de rochas metamórficas deveriam ter 0.1 - 1.0 mg/kg Cd e aqueles derivados de rochas sedimentares 0.3 - 11 mg/kg Cd. Em geral, para a maioria dos solos, espera-se conter < 1 mg/kg, com exceção daqueles contaminados com fontes discretas ou de material parenteral com altas concentrações de Cd.

Em um levantamento feito para os países europeus sobre as contribuições relativas de cádmio das principais fontes antropogênicas, foi estimado que: Os fertilizantes fosfáticos contribuiriam com 54 - 58%; deposição atmosférica 39 - 41%; e os lodos biológicos com 2 - 5% (YOST, 1979; TJELL, 1981 citado por ALLOWAY, 1993) . Estas fontes dariam origem à um aumento anual na concentração de cádmio na Dinamarca de 0,6% (TJELL, 1981 *apud* ALLOWAY, 1993), embora acréscimos muito maiores ocorram em locais próximos à indústrias metalúrgicas ou onde o lodo de esgoto é aplicado ao solo.

2.4.1.1.2 Concentração de cádmio nos solos

Uma pesquisa realizada em solos não contaminados de 36 estados americanos (envolvendo 3.305 amostras) revelou uma variação na concentração de cádmio de 0,005 à 2,4 mg/kg Cd (HOLMGREEN, 1986 *apud* ALLOWAY, 1993). A Tabela 1 fornece dados de vários levantamentos feitos em diversos países.

Tabela 1 - Variações e médias das concentrações de Cádmio em solos (mg/kg) (ALLOWAY, 1993)

Solo	Variação	Média
Dinamarca (agrícola)	0,03 - 0,9	0,22
Suécia (agrícola)	0,03 - 2,3	0,22
Canadá (não agrícola)	0,01 - 0,1	0,07
EUA (agrícola)	0,005 - 2,4	0,27
Ohio, EUA (agrícola)	< 0,1 - 2,4	0,27
Reino Unido (agrícola)	0,01 - 2,4	1,0*
Solos Europeus	-----	0,2 - 0,4

* Valor comum, não a média

2.4.1.1.3 Cádmio em lodos de esgoto

Os efluentes contém cádmio originário das excreções humanas, produtos domésticos que contenham Zn, e efluentes industriais. Quase todo o cádmio se acumula no lodo produzido durante o tratamento de esgoto. Uma ampla faixa de concentrações de cádmio é encontrada no lodo (Tabela 2). As concentrações variam de maior que 1 à 3650 mg/kg Cd na matéria seca.

Tabela 2 - Concentrações de cádmio em lodos biológicos (ALLOWAY, 1993)

Varição (mg/kg)	Fonte do lodo
6,8 - 444	16 cidades (EUA)
3 - 3410	150 estações de tratamento (EUA)
2 - 1100	57 localidades em Michigan (EUA)
0,3 - 168	6 cidades (países baixos)
2 - 1500	42 estações de tratamento (Reino Unido)
< 1 - 90	45 estações de tratamento (Irlanda)
< 2450	Bordeaux (França)
10-20	Helsinki (Finlândia)
2,3 - 171	93 Estações de tratamento (Suécia)
0,3 - 236	7 cidades (Ontário - Canadá)

2.4.1.2 Cobre

Conforme ALLOWAY (1993), O cobre é considerado um dos elementos essenciais mais importantes para plantas e animais. No estado metálico o cobre tem coloração avermelhada, é maleável e um bom condutor de calor e eletricidade. Os usos principais do Cu são na produção de fios e de suas ligas, bronze e latão. Na natureza o cobre forma sulfetos, sulfatos, carbonatos e outros compostos, e também ocorre, em ambientes redutores como metal nativo. O cobre se situa em 26º, logo atrás do Zn, em abundância na litosfera. A abundância média do cobre na litosfera esta em aproximadamente 70 mg/kg enquanto os valores reportados para a crosta terrestre variam de 24 à 55 mg/kg. Para os solos mundiais o valor de 20 mg/kg de Cu da literatura antiga mudou para 30 mg/kg. O cobre se encontra associado com a matéria orgânica do solo, óxidos de Fe e Mn, argilas e outros minerais.

O cobre extraível, algumas vezes denominado de disponível, se refere à quantidade deste elemento no solo que se correlaciona estatisticamente com as concentrações absorvidas e assimiladas pelas plantas. A disponibilidade do cobre para as plantas se refere à prontidão com o

qual o íon disponível $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ é absorvido pelas plantas em solos ácidos e $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$ em solos neutros e alcalinos. A disponibilidade do cobre é relacionada aos potenciais químicos das respectivas espécies na solução do solo. O nível e distribuição do cobre total e extraível no perfil do solo varia com o tipo de solo e o material de origem. O cobre é especificamente adsorvido ou fixado nos solos, tornando-o um dos metais traço que menos se desloca. Altas concentrações de Cobre na camada superficial de um solo são uma indicação da adição de fertilizantes, lodos de esgoto e outros resíduos, fungicidas ou bactericidas, ou estrumes de suínos e cavalos.

A abundância de micronutrientes essenciais nas plantas geralmente se apresentam na seguinte ordem: $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{B} > \text{Zn} < \text{Cu} < \text{Mo} < \text{Cl}$. A confirmação da essencialidade do cobre para plantas foi feita em 1930. Na maioria das espécies vegetais a concentração varia de 5 - 20 mg/kg Cu. Sob condições extremas de solo ou de espécies vegetais específicas, o limite pode se alargar de 1 - 30 mg/kg Cu. Por causa das espécies vegetais e diferenças nos cultivares não é possível dar valores únicos para concentrações de cobre associadas com deficiência ou toxicidade do elemento. O cobre nas plantas atua como parte de grupos prostéticos de sistemas enzimáticos, e como ativador facultativo de sistemas enzimáticos.

Na nutrição animal a deficiência de cobre é quase que totalmente confinada ao gado e ovelhas de pasto devido aos baixos níveis de Cu na forragem ou ao nível normal de Cu acompanhado de ingestão elevada de Mo, S, Fe ou solo que são suficientes para limitar a absorção e retenção de Cu. Sob condições normais o Cu é um agente benigno aos humanos. O Cobre total de um indivíduo adulto se situa entre 100 - 150 mg. A dieta normal provê 1-5 mg Cu/dia e é difícil elaborar uma dieta com menos que 1 mg Cu/dia.

A toxicidade do Cu hereditária em humanos conhecida como doença de Wilson foi descrita em 1912. Para estes indivíduos, os ligantes do cobre envolvidos na homeostasia do cobre são deficientes e níveis tóxicos se acumulam em diversos tecidos. O cobre não é considerado um elemento tóxico de efeito cumulativo. Não obstante, elevadas concentrações deste elemento podem produzir vômitos e uma ingestão oral muito prolongada pode ocasionar estragos no fígado.

2.4.1.2.1 Cobre em lodos de esgoto

Embora a adubação com lodos seja capazes de aumentar substancialmente os níveis de cobre no solo, não existem trabalhos que reportem toxicidade do cobre para plantas quando estas são cultivadas solos férteis e calados. A matéria orgânica do solo aparenta ser o fator dominante no controle da retenção do cobre. Assim a taxa de decomposição da matéria orgânica do lodo se torna uma consideração importante para solos tratados com lodos. Enquanto a toxicidade para plantas superiores seja de maior importância, a atividade microbiana do solo pode ser mais sensível as adições de cobre.

2.4.1.3 Chumbo

Conforme ALLOWAY, (1993), quando o chumbo é liberado no ambiente, este possui um longo tempo de residência comparado com a maioria dos poluentes. Como resultado, o chumbo e seus compostos tendem a se acumular nos solos e sedimentos, onde, devido à sua baixa solubilidade e relativa resistência à degradação microbiana, estes permanecem acessíveis à cadeia alimentar e ao metabolismo humano por muito tempo. O chumbo é venenoso e existem suspeitas que antes que qualquer sintoma clínico apareça ele possa causar problemas mentais em crianças. Não existem evidências significantes de que o chumbo exerça qualquer papel essencial no metabolismo. Várias investigações tem sido feitas quanto ao chumbo no ambiente, incluindo solos, nos últimos vinte anos e agora temos um entendimento mais detalhado da sua química no solo e significância ecológica e sanitária.

O chumbo pode se encontrar em dois estados de oxidação $Pb(II)$ e $Pb(IV)$ que são estáveis, mas no ambiente o elemento predominante é o íon Pb^{2+} . No seu estado elementar o chumbo é denso (11.3 pg/cm^3), metal azul-acinzentado que se funde à 327°C e ferve à 1744°C . O baixo ponto de fusão permitiu que fosse fundido e trabalhado mesmo em sociedades primitivas. O metal é bem maleável e tende a escorrer sob pressão, assim pode ser facilmente cortado e moldado, e desde os tempos mais antigos tem sido usado como cano e telhas. O chumbo metálico opõe razoável resistência à radiação ionizante, tornando um bom protetor em trabalhos que utilizem o Raio-X e radioisótopos. O chumbo se liga prontamente com outros metais: a liga Pb/Sb é usada

principalmente na confecção de placas de baterias e a liga Pb/Sn são usadas geralmente em soldas. O metal chumbo combinado com o PbO_2 é utilizado para fabricar a bateria ácida. Outros compostos inorgânicos com chumbo amplamente usados são as tintas que contêm óxidos de chumbo ou sabões de chumbo que promovem a polimerização. Existem uma ampla gama de compostos orgânicos à base de Pb(IV), especialmente os compostos tetra alquil e tetra aril.

2.4.1.3.1 Chumbo em lodos de esgoto

Uma fonte de chumbo nos solos que alcançou importância considerável nos últimos anos é o lodo de esgoto. Devido à propriedade dos resíduos orgânicos de reter íons metálicos por complexação, o lodo se torna uma reserva considerável de metais pesados. O chumbo, juntamente com o Cádmio são os elementos mais preocupantes, pois não exercem nenhuma função biológica conhecida em vegetais ou animais.

2.4.1.4 Zinco

Conforme ALLOWAY (1993), o zinco é um elemento traço essencial ao seres humanos, animais e plantas superiores. Embora os efeitos benéficos do Zn no crescimento de *Aspergillus niger* fossem descobertos por Raulin em 1869-1870, a descoberta da essencialidade do Zn para as plantas superiores em 1926 é atribuída à Sommer e Lipman.

O zinco é considerado essencial para seres humanos e animais, i.e. uma deficiência resulta em prejuízo do funcionamento normal do organismo, e a suplementação com níveis fisiológicos deste elemento, e não outros, previne ou cura esta deficiência. A ingestão diária recomendada para adultos gira em torno de 15 mg/dia. O zinco age como um componente estrutural ou catalítico em várias enzimas envolvidas no metabolismo energético, transcrição e translação. Os sintomas da deficiência do zinco nos humanos e animais são a ausência de apetite, deficiência severa no crescimento, lesões na pele e imaturidade sexual. Para os humanos a depressão ou imunocompetência e a perda da acuidade do paladar também podem ocorrer.

As plantas superiores absorvem o Zn como um cátion divalente (Zn^{2+}), que age tanto como um componente metálico de enzimas ou como um cofator funcional, estrutural ou regulador de um grande número de enzimas, como as desidrogenases, aldolases, isomerases, trophosforilases, RNA e DNA polimerases. Por causa destas funções o zinco está envolvido no metabolismo das proteínas

e carboidratos. O Zinco também é necessário para a síntese do triptofano, um precursor para a síntese do ácido indol-acético (IAA).

Culturas que são particularmente sensíveis à deficiência do Zn são os cereais, milho, sorgo, linho, algodão, legumes, uvas, cítricos e árvores frutíferas (pêssego, maçã). Em geral, a maioria dos sintomas permanentes de deficiência de Zn são a clorose entre os veios (principalmente nas monocotiledôneas), crescimento atrofiado, má formação do caule e das folhas.

A concentração de Zn nas plantas varia consideravelmente, como função de diferentes solos e fatores climáticos e também dos genótipos das plantas. Como uma aproximação geral, as seguintes faixas de concentração de Zn podem ser adotadas para o tecido de folhas desenvolvidas; (I) deficiente se menos que 10-20 mg/kg de matéria seca; (II) suficiente ou normal se estiver entre 25-150 mg/kg; (III) em excesso ou tóxica se acima de 400 mg/kg.

2.4.1.4.1 O Zinco em lodos de esgoto

Os lodos de esgoto contém geralmente grandes quantidades de Zn, que podem afetar as culturas vegetais. O zinco no esgoto bruto tende à estar associado com os sólidos em suspensão, que são dissociados durante o tratamento biológico. O tratamento biológico aeróbio de esgotos convencional remove 40-47% do Zn do Influyente.

O lodo varia muito quanto à concentração de Zn, que é geralmente maiores que os níveis encontrados nos solos.

Se torna claro que o uso indiscriminado do lodo de esgoto em solos agrícolas levaria à uma acumulação de Zn, constituindo em um risco permanente para plantas e cultivares. Neste contexto vários esforços tem sido feitos para minimizar estes riscos pela regulamentação do uso do lodo de esgoto em solos agrícolas. As normas para o lodo tem sido adotadas em vários países, e são geralmente baseadas nos seguintes conceitos:

a) Que as concentrações de Zn no lodo não excedam os limites estabelecidos. As diretivas da comissão da Comunidade Econômica Européia recomenda como concentração máxima 2500 e 4000 mg/kg Zn. Para a maioria dos países o máximo permissível de Zn total em lodos fica na faixa de 100-5000 mg/kg Zn.

b) que as concentrações de Zn nos solos não possam exceder os limites definidos. Na maioria dos países é adotado um nível máximo de 300 mg/kg Zn total .

c) Que as cargas de metais pesados aplicadas aos solos agrícolas não possam exceder os limites definidos. As diretivas da CEC (Comunidade Económica Europeia) propõem valores de 175-550 kg/ha como carga máxima de Zn, no entanto se assume que a concentração normal de Zn seja de 80 mg/kg e que o aumento de 1mg/kg Zn no solo (na camada superficial de 20 cm) seja resultado da aplicação de 2.5 kg/ha Zn.

d) que o Zn tende a causar menos problemas se for adicionado em vários incrementos pequenos durante um período longo de tempo, do que em um ou poucos grandes incrementos. Neste contexto a CEC sugere que a carga anual de Zn seja de 30 kg/ha baseado numa média de 10 anos.

2.4.2 PAPEL DOS ELEMENTOS INORGÂNICOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL

Os animais necessitam de vários elementos químicos para manter seu metabolismo normal e podemos agrupar estes elementos em duas classes: Macroelementos (Ca, Mg, Na, K, P, S, Cl), necessários em quantidades relativamente grandes, da ordem de gramas por dia, e que geralmente exercem mais de uma função; e os microelementos, necessários em quantidades diárias na ordem de miligramas ou microgramas (15 de interesse animal). A maioria dos microelementos funcionam como grupos prostéticos ou cofatores de enzimas. Nestas enzimas os elementos essenciais parecem funcionar de pelo menos três formas diferentes: (1) o elemento essencial pode ter atividade catalítica própria sobre uma reação química e esta atividade é muito aumentada pela proteína enzimática, isto é especialmente verdade quanto ao ferro e ao cobre; (2) o íon metálico essencial pode formar um complexo com o substrato e com o sítio catalítico da enzima, desta forma ele aproxima os dois em uma forma ativa; (3) um íon metálico essencial pode funcionar como um potente receptor de elétrons em algum momento do ciclo catalítico.

2.4.3 EFEITOS DOS METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS

A fauna dos lodos biológicos, composta principalmente de bactérias e protozoários tem comportamentos variados quanto a presença de uma alta concentração de metais pesados. LASKAUSKAITE (1989), reporta que em uma comparação de dois lodos onde o diferencial era a concentração de metais pesados, não houve alteração na população de protozoários.

Segundo a Norma L5.220 - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos (CETESB, 1985), é necessário a adição de 0,3 ml de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 ml de amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 ml de uma solução a 10% para cada 100 ml de amostra). O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica dos metais pesados, apresentando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne a ação bactericida do cobre.

KOUZELI-KATSIRI et al., (1988) desenvolveram um método para avaliação da toxicidade dos metais pesados em lodos anaeróbios. O método se baseia no monitoramento da produção diária de gás e na porcentagem de redução dos sólidos voláteis. Por este método fixaram valores-limite de toxicidade dos metais á flora anaeróbia.

2.5 APLICABILIDADE DAS TÉCNICAS BIOHIDROMETALÚRGICAS NA DESCONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS

Analisando o potencial de aplicabilidade da técnica biohidrometalúrgica na descontaminação de metais pesados em lodos biológicos, TYAGI et al., 1988) iniciaram os estudos de adaptação desta técnica, obtendo bons resultados, que variavam de acordo com o metal considerado.

Dependendo do tipo de lodo de esgoto considerado (primário, lodo ativado e lodo digerido), varia a eficiência do processo de solubilização. Esta diferença pode ser explicada principalmente pela predominância de determinados tipos de espécies inorgânicas (HAYES & THEIS, 1978³). Durante a digestão anaeróbia, a química dos metais pesados é controlada não só pela solubilidade

³ HAYES, T.D. & THEIS, T.L. The distribution of heavy metals in anaerobic digestion. J. Water Pollut. Control Fed., 50(1), 61-72. 1978

dos precipitados inorgânicos, mas também pela adsorção e posterior incorporação dos metais na biomassa do digestor. Existem evidências que sugerem que os metais pesados associados com a fração orgânica do lodo estão menos disponíveis para a disposição no ambiente do que os precipitados inorgânicos (LEPPER, 1972; CHANEY, 1973). No caso específico de ambientes ácidos esperaria-se que os precipitados se solubilizassem rapidamente, no entanto para os metais ligados à moléculas orgânicas, seria necessária uma exposição mais prolongada sob condições mais ácidas para que ocorresse a remoção e recuperação dos metais pesados.

2.5.1 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM LODOS BIOLÓGICOS

Existem vários métodos que se propõem a realizar a diminuição da concentração de metais pesados em lodos biológicos.

2.5.1.1 Biológicos

2.5.1.1.1 Acumulação de metais nas células de microrganismos

Este processo de descontaminação se baseia no acúmulo de metais pesados na parede celular dos microrganismos, principalmente bactérias. As gram-positivas apresentam uma porcentagem de bio-acumulação em torno de 30% a mais que em relação às gram-negativas, (GOURDON et al., 1990). LOWE & GAUDY (1989) propõe um método de tratamento modificado, que faria com que uma população microbiana se desenvolvesse, e que esta teria propriedades de adsorção de metais na parede celular, iguais ou melhores à culturas puras específicas.

SCOTT et al.,(1986), em trabalho realizado com a camada de polissacarídeos da membrana celular do microrganismo *Pseudomonas putida*, reportou uma porcentagem de remoção de 100% de cádmio (na faixa de 0,5 - 1,5 mg/l), através da adsorção realizada pela camada polissacarídica.

VENKOBACHAR (1990) , realizou trabalho com bio-adsorção de metais pelos fungos *Aspergillus niger* e *Ganoderma lucidum*. Em outro estudo utilizou-se o fungo *Brettanomyces lambicus* para descontaminação do chumbo e zinco (WENZL et al., 1990)

SUYAMA et al. (1994) propôs um novo biomaterial obtido a partir de uma membrana da casca de ovo para reter cátions metálicos em soluções diluídas de lodo.

2.5.1.2 Químicos

2.5.1.2.1 Lixiviação ácida

O método químico da lixiviação ácida, reportado por TYAGI et al. (1988), consistia na adição de ácido sulfúrico até que ocorresse a lixiviação dos metais. Este método, altamente oneroso, foi utilizado somente em escala laboratorial.

2.5.1.2.2 Tratamento com EDTA

Este tratamento consiste na quelação dos íons metálicos através do EDTA, através de um efluente específico da indústria petroquímica (KASAN & BAECKER, 1989; SHAY & ETZEL, 1992)

2.5.1.3 Químico-biológicos

2.5.1.3.1 *Bactérias oxidantes de ferro nativas e adaptadas do próprio lodo*

- Este método é apropriado para se confirmar a existência e se obter um lodo adaptado com uma população de bactérias oxidantes de ferro no lodo acima do normal, possibilitando que o processo de bio-lixiviação se desenvolva. Consiste basicamente na incubação do lodo sob agitação, com pH ajustado para 4.0 e com suplementação de ferro (II). Quando o potencial redox sobe acima de 500 mV e o pH caia abaixo de 2.5, é transferida uma alíquota de 5% deste para um lodo fresco, adicionado de 0,5% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Este processo é repetido até que o potencial redox aumente constantemente acima de 500 mV em 2 transferências consecutivas. Neste momento se assume que exista uma população de *Thiobacillus* totalmente adaptada (TYAGI et al. , 1992; COUILLARD & CHARTIER, 1991a; COUILLARD et al. , 1991b; COUILLARD et al. , 1991c; COUILLARD & MERCIER, 1991d; COUILLARD & MERCIER, 1991; COUILLARD & MERCIER, 1990).

2.5.1.3.2 *Bactérias oxidantes de ferro exóticas ao lodo*

São utilizadas cepas padrão (ATCC - American Type Collection Culture), do gênero *Thiobacillus* que são então submetidas ao processo de biolixiviação (TYAGI et al., 1990)

2.6 DISPOSIÇÃO DO LODO EM SOLO

A disposição do lodo em solos agrícolas, tem mostrado algum aumento na produção (BUCHGRABER & SCHECHTNER, 1989 ; BUGBEE et al., 1991; LERCH et al., 1990) e tem se

comprovado que o nitrogênio e o carbono proveniente de lodos são fontes de N e C, facilmente assimiláveis (LERCH et al., 1992).

Além da utilização do lodo de esgoto em solos agrícolas como fertilizante e condicionador do solo, existem 5 outros métodos bem utilizados de disposição no solo:

- Irrigação;
- "Shallow lagooning";
- "Trenching";
- "Disposal to refuse tips";
- "Land reclamation";

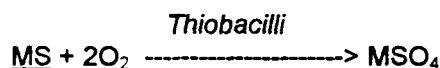
O solo usado para estes métodos de disposição pode ser classificado como de sacrifício ou preparo. Irrigação, "Shallow lagooning" e entrincheiramento contínuo são executados permanentemente e intensivamente em pequenas áreas de terra. Assim, devido ao nível de contaminação que resulta inevitavelmente das altas cargas de lodo aplicadas, esta se torna inadequada para a agricultura, e provavelmente nunca serão novamente.

2.7 MECANISMOS DE LIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS POR *Thiobacillus ferrooxidans*

Existem basicamente 2 mecanismos de lixiviação de metais pesados por *T. ferrooxidans*

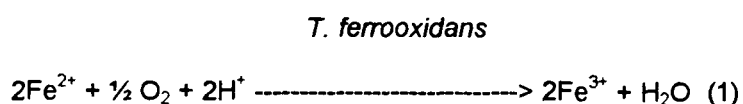
2.7.1 DIRETO

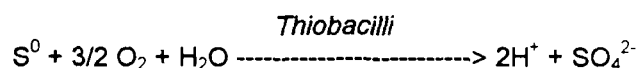
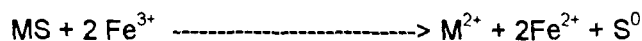
Onde os sulfetos são oxidados à sulfatos pela bactéria.



2.7.2 INDIRETO

Onde os íons férricos produzidos pela oxidação do íon ferroso pela bactéria reagem quimicamente com os sulfetos metálicos para produzir Fe(II), fechando o ciclo.





onde: MS = sulfeto metálico insolúvel

O íon férrico é um oxidante potente e como tal é usado na hidrometalurgia para dissolução de vários minerais. No entanto, durante as reações o íon férrico se torna reduzido a íon ferroso, uma forma química sem qualquer capacidade oxidante. Para formar o ferro trivalente, ele tem que ser reoxidado de volta para o estado de oxidação mais elevado. Isto é feito geralmente com o oxigênio em presença de ácido (vide equação 1). A propriedade oxidante faz do íon férrico um dos reagentes mais úteis na hidrometalurgia. a utilização do íon férrico é seriamente afetado pela sua lenta cinética de formação, e vários métodos tem que ser investigados para aumentar a taxa de oxidação dos íons Fe(II). A conclusão geral, considerando o aumento da velocidade de oxidação do íon ferroso, é que algum tipo de catalisador, como o dióxido de enxofre, carvão ativado, íon cúprico, etc., tem que estar presente. Outro método para aumentar a taxa de oxidação do íon ferroso é usar bactérias apropriadas que necessitam oxidar o íon ferroso para íon férrico para satisfazer suas necessidades energéticas de crescimento, como é o caso do *Thiobacillus ferrooxidans*..

Á partir destes mecanismos, grupos de pesquisa canadenses iniciados por TYAGI et al., (1988) iniciaram experimentos para utilização destes princípios em lodos biológicos, objetivando a descontaminação de metais pesados.

Os metais pesados nos lodos de estações de tratamento de esgotos, se encontram geralmente na forma de sulfetos de metais pesados (MS), principalmente em lodos anaeróbios, devido à suas condições redutoras (COUILLARD & MERCIER, 1990). E estes sulfetos podem ser utilizados como substrato pelo *T. ferrooxidans* (WONG & HENRY, 1984). No entanto, estudos de especiação de metais pesados em lodos anaeróbios e aeróbios mostraram não haver diferença significativa entre estes lodos referentes ao conteúdo de fração oxidável que representa os sulfetos metálicos e metais ligados organicamente. Sem alegar que o conteúdo de sulfetos seja tão alto no lodo aeróbio do que no lodo anaeróbio, podemos esperar que o lodo aeróbio contenha uma fração dos metais que estejam presentes como sulfetos (COUILLARD & MERCIER, 1990).

Resistência à cátions metálicos

A possibilidade de se utilizar bactérias do gênero *Thiobacillus* na lixiviação de metais pesados é condicionada pela resistência inerente destes microrganismos às concentrações de metais pesados destas soluções. A característica diferencial dos microrganismos do gênero *Thiobacillus*, e em particular da espécie *Thiobacillus ferrooxidans* é a resistência, não compartilhada pela maioria dos microrganismos à concentração de íons metálicos de mesma ordem de magnitude dos processos hidrometalúrgicos típicos.

O efeito dos metais pesados nos microrganismos depende da sua concentração na solução podendo ser bactericidas (os microrganismos são mortos), ou bacteriostáticos (o crescimento é inibido mas os microrganismos não são mortos).

A tolerância do *Thiobacillus ferrooxidans* aos cátions metálicos é atribuída à habilidade das células em excluir cátions metálicos da sua estrutura interna.

O conhecimento teórico que permitiu acreditar na existência deste organismo em lodos de esgoto foi obtido em estudo feito com 19 lodos (primários, secundários, anaeróbios, aeróbios e de lagoas de estabilização) do Canada e EUA, onde foi constatada a presença de *Thiobacillus* em todos (TYAGI et al., 1992)

2.8 GÊNERO *Thiobacillus*

Conforme o Manual de Bergey, Vol 4. , as bactérias do gênero *Thiobacillus* são gram-negativas em forma de bastonete ($\sim 0,5 \times 1,0-4,0 \mu\text{m}$) com algumas espécies móveis por meio de flagelos polares. Não possuem formas de resistência conhecidas. Obtém energia da oxidação de um ou mais compostos de enxofre reduzidos, incluindo sulfetos, enxofre, tiosulfato, politionatos e tiocianato. O sulfato é o produto final da oxidação dos compostos sulfurados, embora o enxofre, sulfitos ou politionatos possam ser acumulados. Algumas espécies podem obter energia também da oxidação do íon ferroso para o íon férrico. Todas as espécies podem fixar CO_2 pelo ciclo Benson-Calvin e são capazes de crescimento autotrófico. Algumas espécies são quimiolitotróficas obrigatórias, enquanto que outras são capazes de crescer quimiorganotróficamente. O gênero inclui

aeróbios obrigatórios e tipos desnitrificantes facultativos. As espécies deste gênero exibem pH ótimo de crescimento na faixa de 2-8 e temperatura ótima de 20-43°C.

Validade Taxonômica

Devido à grande heterogeneidade fisiológica e genética dos microrganismos deste gênero, constatada pela relação mol% G+C do DNA, diversidade de homologia do DNA, variedades de ubiquinona, conteúdo de ácidos graxos e a existência de espécies quimiolitotróficas e quimiorganotróficas, a validade taxonômica deste gênero pode ser discutida. O único fato que reúne estes microrganismos é que todas são eubactérias em formato de bastonete que obtém energia para o seu crescimento autotrófico da oxidação de enxofre inorgânico.

2.9 *Thiobacillus ferrooxidans*

Conforme Temple and Colmer, 1951 - (Bergey's manual - vol. 4), a espécie *Thiobacillus ferrooxidans* consistem de bastonetes, geralmente únicos ou aos pares, 0,5 x 1,00 µm; móveis. A linhagem-tipo é móvel por um único flagelo polar. Constituem pequenas colônias (0,5 - 1 mm) crescidas em ágar tiosulfato ou tetracionato. O meio líquido com sulfato ferroso à pH 1,6 muda de uma coloração esverdeada para âmbar a marrom-avermelhada devido ao sulfato férrico. À pH acima ou igual a 1.9 ocorre precipitação e incrustação considerável com sulfatos férricos básicos (jarositas).

São quimiolitotróficas e autotróficas obrigatórias. Oxidam e se desenvolvem em ferro (II), pirita, vários minerais de sulfetos, enxofre, tiosulfato ou tetracionato. Estritamente aeróbios. Podem usar sais de amônia e provavelmente nitratos como fonte de N. São capazes também de fixar nitrogênio.

Temperatura ótima: 30-35°C; faixa de crescimento de 10-37°C (nenhum crescimento a 42°C). pH ótimo: aproximadamente 2,5; Faixa de pH com crescimento: 1,3 - 4,5. Isolados em vários locais do mundo onde existe ferro oxidável, minerais, sulfetos e enxofre.

É importante ressaltar que na biohidrometalurgia, a identificação da bactéria como sendo *Thiobacillus ferrooxidans* é baseada na observação dos seguintes atributos (ROSSI, 1990):

- Crescimento como cultura pura em um meio de sulfato ferroso onde o íon ferroso é a única fonte de energia;

- Aeróbios obrigatórios;
- Mesófilos
- Autótrofos
- Acidófilos

No entanto, deve se ter em mente que o microrganismo *Thiobacillus ferrooxidans* não é o único capaz de oxidar o ferro e que exerce um papel importante nos processos bio-hidrometalúrgicos

2.10 TEORIA DE MONOD E SUA APLICAÇÃO NA CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE CULTURAS DE *Thiobacillus*

Analisando-se o status atual do cultivo contínuo de microrganismos, é marcante a influência que a teoria de MONOD (1941) exerceu e continua exercendo na área de pesquisa em microbiologia, fermentação e suas ramificações. Como uma semente no estabelecimento de uma cultura em fermentação, a fundamentação na qual a técnica de cultivo contínuo se baseia e o ponto de partida da qual várias modificações se estenderam.

A teoria de Monod foi baseada na análise do crescimento exponencial em culturas puras de microrganismos, é um modelo essencialmente matemático. Consequentemente tem as vantagens e desvantagens que tal teoria matemática envolve. Os modelos matemáticos são formados por equações, de modo que se espera que a performance destes modelos reflitam somente o grau de precisão definidos pela(s) equação(ões) usada(s), não importando quão boas ou ruins sejam as manipulações envolvidas.. Este é o ponto fraco e forte da teoria de Monod.

BARFORD e HALL, 1978⁴ citado por DAWSON, 1985 consideraram a modelagem matemática do crescimento microbiano em uma revisão recente e concluíram que o modelo Monod ainda é o melhor exemplo na formulação de um modelo matemático para descrever o crescimento microbiano. No entanto é importante considerar que o modelo Monod se baseia em premissas simples, e é importante reconhecer estas limitações inerentes ao modelo.

O modelo Monod relata o crescimento em um meio simples e definido para a concentração de um nutriente limitante, sob condições ambientais constantes. Também assume que os

microrganismos se desenvolvem de uma maneira uniforme (sob condições de crescimento balanceado). Nestas condições, o crescimento é descrito por uma única variável, um único passo de uma reação com estequiometria restrita, de tal modo que o rendimento seja constante (DAWSON, 1985).

O modelo convencional de Monod é útil para descrever o crescimento limitado pelo carbono dos heterótrofos. Quando o substrato limitante do crescimento é incorporado como material celular. Quando o *Thiobacillus ferrooxidans* é desenvolvido em ambiente contendo ferro reduzido, o substrato limitante de energia não é incorporado como material celular. O modelo de Monod depende de uma produção constante, que relaciona a taxa de crescimento específico à remoção do substrato. O modelo de Monod foi modificado também para acomodar a possibilidade que a produção possa aumentar com o aumento da taxa de crescimento (i.e. manutenção de energia). Mas é menos adaptável à possibilidade de que o produto possa diminuir com o aumento da taxa de crescimento.

A diminuição do produto com o aumento da taxa de crescimento é normalmente observada em uma grande variedade de microrganismos crescidos em fermentadores sob a limitação de íons inorgânicos como o fosfato, magnésio, silicato, amônio, nitrato e vitaminas (B12). O modelo cinético de armazenagem interna (Internal stores model) proposto por Droop e modificado por Rhee tem sido usado para descrever taxas de crescimento em função de concentrações internas mais do que externas dos substratos limitantes. É essencial neste modelo cinético que os produtos variem inversamente com a taxa de crescimento, desde que as concentrações do substrato intracelular aumentem com o aumento da taxa de crescimento. A aplicação tanto do modelo de Monod ou do armazenamento interno para o crescimento de culturas de *Thiobacillus ferrooxidans* é limitado, mas apesar destas limitações, ambos os modelos podem ser usados para descrever matematicamente o crescimento e funções de oxidação de ferro (BRADDOCK et al., 1984).

2.11 FIXAÇÃO DE CO₂ EM MICRORGANISMOS

A principal via de redução do CO₂ para carbono orgânico é através do ciclo de Calvin, que consiste em uma série de reações de fixação, redução e regeneração da molécula aceptora de CO₂.

⁴ BARFORD, J.P. & HALL, R.J., Evaluation of approaches to mathematical modelling of microbial growth, Process Biochem., 22(8), 1978

Os principais microrganismos que realizam a fixação de CO_2 são as bactérias aeróbias quimiolitotróficas; bactérias fotossintetizantes, incluindo as cianobactérias; Espécies de *Pseudomonas*; Actinomicetos, Rizóbios; algumas bactérias metilotróficas e algas.

Com exceção da especificidade do nucleotídeo piridina da reação da desidrogenase gliceraldeído fosfato, o esquema é o mesmo nos procariontes e eucariontes. O resultado bruto do ciclo de Calvin é a produção de uma molécula de triose fosfato a partir de 3 moléculas de CO_2 . Embora este ciclo seja a via assimilatória mais utilizada na biosfera, várias espécies autotróficas fixam CO_2 por rotas diferentes, como a redução do CO_2 para acetato (e outros ácidos graxos de cadeia curta) pelas bactérias acetogênicas ou metano pelas metanogênicas.

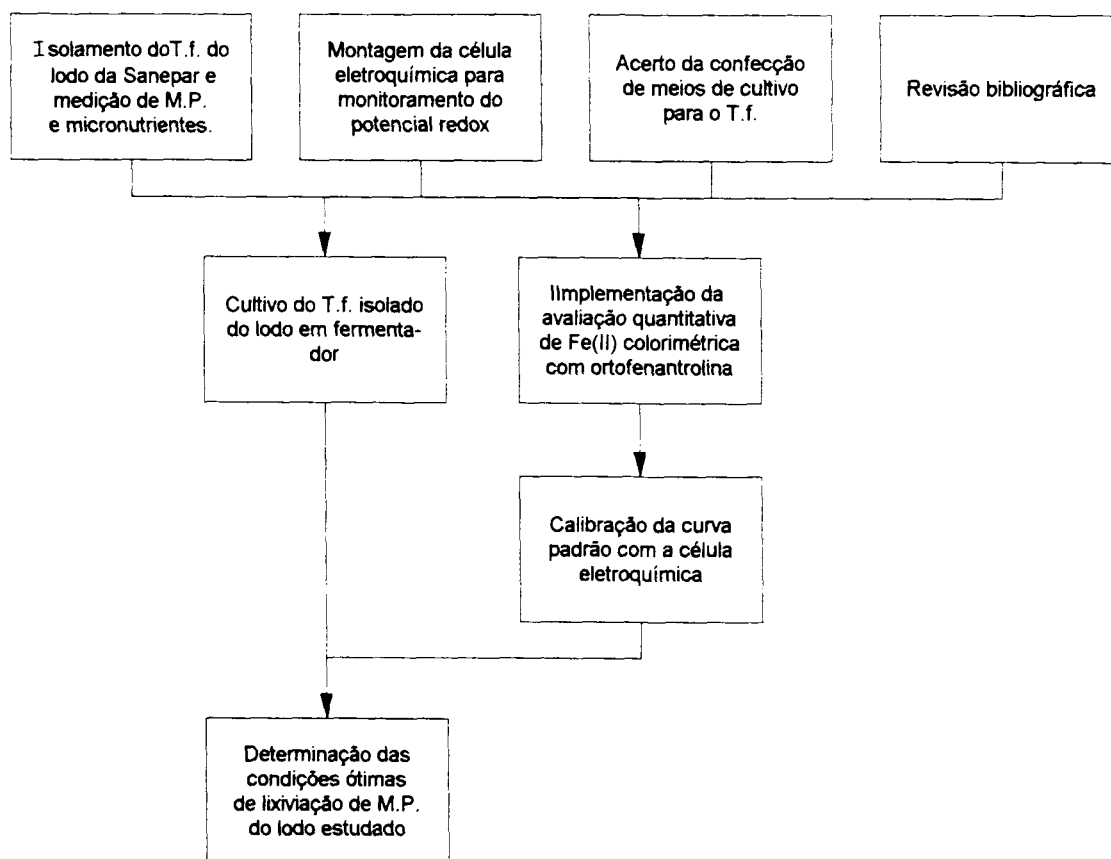
Algumas espécies de *Thiobacillus* facultativos são capazes de oxidar tanto compostos sulfurados reduzidos como material orgânico. Na maioria dos casos a oxidação do substrato orgânico causa um bloqueio da repressão da síntese do maquinário da fixação de CO_2 . Em culturas de batelada em substratos orgânicos *T. novellus* e *T. versutus* inibiram completamente o metabolismo autotrófico, sugerindo que o metabolismo heterotrófico e autotrófico são incompatíveis.

Um dos principais catalisadores-chave do ciclo de Calvin é a Ribulose 1-5 bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBPC/O), que é sem dúvida, a proteína mais abundante na biosfera, e provavelmente a enzima mais estudada. A razão da sua abundância se deve provavelmente à sua baixa eficiência como catalizador. Com um "turnover" de 1.000 para 2.000 mol de CO_2 fixados por mol de enzima por minuto. Há necessidade que as células sintetizem grandes quantidades desta enzima para que ela sobreviva somente com o CO_2 como fonte única de carbono. A RuBPC/O catalisa também a oxigenólise do RuBP, resultando eventualmente na produção de ácido glicólico (TABITA, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ESQUEMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO TRABALHO DE TESE

FIGURA 5 - ESQUEMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE A TESE



3.2 AMOSTRA

As amostras de lodo utilizadas nos experimentos de cultivo do lodo artificial e enriquecimento de *Thiobacillus* foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgotos Belém (ETE - Belém) da Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR (Curitiba - Paraná - Brasil).

3.3 REAGENTES

Tabela 3 - Reagentes utilizados

Material	Fabricante	Descrição
1,10 fenantrolina	Merck	$C_{12}H_8N_2 \times H_2O$
Acetato de amônia ACS	Merck	CH_3COONH_4
Acetato de cádmio cristalizado P.A.	Baker	$Cd(CH_3COO) \times 2H_2O$
Acetato de chumbo cristalizado P.A.	Ecibra	$Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$
Acetato de cobre P.A.	Merck	
Acetato de sódio Cristalizado P.A.	Merck	$CH_3COONa \times 3H_2O$
Acetato de zinco P.A.	Merck	$(CH_3COO)_2Zn \times 2H_2O$
Ácido clorídrico P.A.	Merck	HCl
Ácido Nítrico P.A.	Merck	HNO_3
Ácido sulfúrico P.A.	Merck	H_2SO_4
Agarose Type IV P.A.	Sigma	
Bacto-peptona	Difco	
Dextrose P.A.	Difco	
Enxofre P.A.	Merck	S elementar
ferricianeto de potássio P.A.	Merck	$K_3[Fe(CN)_6]$
Fluoreto de potássio P.A.	Merck	KF
Fosfato de potássio dibásico P.A.	Merck	K_2HPO_4
Haxacianoferrato (II) de potássio trihidratado P.A.	Merck	$K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O$
Sulfato de Magnésio	Reagen P.A.	$MgSO_4 \times 7H_2O$
Sulfato ferroso heptahidratado P.A.	Merck	$FeSO_4 \times 7H_2O$
Sulfeto de sódio	Merck	Na_2S

3.4 SELEÇÃO DOS METAIS PESADOS ESTUDADOS

Para este estudo foram escolhidos os elementos cobre (Cu), zinco (Zn), chumbo(Pb) e cádmio (Cd) seguindo os seguintes critérios:

- Fitotoxicidade
- Zootoxicidade
- Concentração média nas amostras de lodo estudadas:

Elementos como o cobre, zinco são considerados essenciais, desempenhando papel biológico importante tanto em animais como vegetais, porém em níveis relativamente elevados, como os encontrados nas amostras de lodo analisadas, também exercem efeitos deletérios. O mercúrio, que apesar de não ser essencial e ser altamente tóxico não foi incluído por não apresentar concentrações no lodo estudado que justificassem seu estudo. O cromo, inicialmente considerado neste estudo, foi recentemente eliminado da lista dos principais metais pesados que

restringem o uso de lodos em solos, pois em estudo conduzido pelo EPA (EPA, 1995; IZSAKI et al., 1989), não foi demonstrado nenhum retardamento no crescimento de vegetais até a concentração de 3.000 kg/hectare. Além disso, foram feitos estudos de exposição ocupacional de tratoristas, que trabalharam em solos que receberam lodos com concentrações de cromo até 3.000 kg/hectare. Neste estudo levou-se em conta também que somente uma porcentagem mínima deste cromo se encontra na forma hexavalente, e a maior parte na forma trivalente (a menos tóxica) (EPA, 1995). Como a biolixiviação atua basicamente com sulfetos. O Cromo não é encontrado nesta forma, e sim na forma de hidróxido, devido principalmente aos respectivos produtos de solubilidade. O cromo acaba se precipitando como hidróxido de cromo antes que se forme o sulfeto de cromo.

O mercúrio e o cádmio são conhecidos por seus efeitos acumulativos, e mesmo estando em concentrações baixas podem ser potencialmente perigosos. Nenhum destes dois elementos é essencial.

3.5 SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METAIS PESADOS ESTUDADOS

Como este trabalho se baseia principalmente nos estudos de biolixiviação do grupo de pesquisa canadense, resolveu-se adotar os limites máximos permitidos de metais pesados do Canadá (Tabela 4). Como o cobre não consta nesta legislação, adotou-se o valor de 500 mg/kg (valor adotado pela Bélgica - Tabela 4). Assim, temos as seguintes concentrações, que foram utilizadas nos experimentos: (500 mg/kg Pb; 20 mg/kg Cd; 1850 mg/kg Zn e 500 mg/kg de Cu).

Tabela 4 - Concentração máxima permitida de metais pesados (mg/kg peso seco) em lodos considerados aceitáveis para uso agrícola

País	Cd	Zn	Cu	Ni	Pb	Cr	Mn	Mo	Co	As	Se	Hg
Bélgica	10	2000	500	100	300	500	500	--	20	10	25	10
Canadá	20	1850	--	180	500	--	--	20	150	75	14	5
Dinamarca	8	--	--	30	400	--	--	--	--	--	--	6
Finlândia	30	5000	3000	500	1200	1000	3000	--	100	--	--	25
França	20	3000	1000	200	800	1000	--	--	20	--	100	10
Alemanha	20	3000	1200	200	1200	1200	--	--	--	--	--	25
Países Baixo	10	3000	1500	100	300	200	500	--	20	--	--	10
Noruega	10	3000	1500	100	300	200	500	--	20	--	--	7
Suécia	15	10000	3000	500	300	1000	--	--	50	--	--	8
Suíça	30	1000	1000	200	1000	1000	--	20	100	--	--	10

Fonte: WEBBER et al., 1983

3.6 EQUIPAMENTOS

Tabela 5 - Equipamentos utilizados

Material	Fabricante
Centrífuga 10.000 RPM	Sorvall
pHmetro digital e medidor do potencial redox	Oriba
Espectrofotômetro Siel 500	Siel
5 aeradores para aquário	Brasil
2 Cubas de 10 litros	
Banho-maria com agitação	Fanem
Banho maria sem agitação	Fanem
Sistema de deionização de água	
Milli-Q - Microfiltração de água	Millipore
Pipetador automático	
Bomba de vácuo	

3.7 MEIOS DE CULTIVOS

Os meios de cultivo para bactérias ferro oxidantes requerem cuidados adicionais na hora do preparo, pois ao contrário das bactérias heterótrofas comuns, as primeiras não toleram muito bem altas concentrações de matéria orgânica, chegando a inibir seu desenvolvimento. Uma série de trabalhos abordou a problemática do cultivo das bactérias do gênero *Thiobacillus* (SILVERMAN &

LUNDGREN, 1959; TUOVINEN & KELLY, 1973; TYAGI, 1991a; JONES & KELLY, 1983), pois o rendimento energético da oxidação de compostos inorgânicos é menor que o da utilização de substratos orgânicos, fazendo com que seja necessário um tempo maior de incubação para o crescimento de uma biomassa razoável.

3.7.1 MEIO 9K MODIFICADO EM CONCENTRAÇÃO SIMPLES PARA *Thiobacillus ferrooxidans*

- Solução 1 (sais de base).....700 ml
- solução 2 (fonte de energia).....300 ml

a) Preparar a solução 1 (sais de base) com a seguinte composição:

- Sulfato de Amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$3g
- Sulfato de Magnésio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$0.5g
- Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4)0.5g
- Cloreto de potássio KCl0.1g
- Nitrato de Cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$0.01g
- Ácido Sulfúrico $[\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1N}]$ 1 ml
- H_2O 700 ml

pH final após esterilização: 2,8 a 3,0

Para o preparo dessa solução, pesar os reagentes e acrescentar 700 mL de água destilada. Ajustar o pH para 2,8 a 3,0. Esterilizar em autoclave.

b) Preparar a solução 2 (fonte de energia) com a seguinte composição:

- Sulfato ferroso $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 44,22 g
- água destilada300 ml

Para esse preparo, pesar 44,22 g de sulfato ferroso, colocar em balão volumétrico de 300 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar até a completa dissolução do sulfato ferroso e esterilizar por filtração em membrana com porosidade de 0,20 μm .

c) juntar as soluções 1 e 2 e , com todos os cuidados de assepsia, distribuir volume de 10 ml em tubos de ensaio estéreis tamponados de 16 mm x 150 mm.

d) os tubos de ensaio, contendo o meio 9K modificado, podem ser armazenados sob refrigeração, durante o período máximo de 2 semanas.

3.7.2 MEIO T&K

- Solução de Sais800 ml
- Solução de Sulfato ferroso200 ml

Solução de Sais

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 g
- K_2HPO_4 0,4 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$0,4 g
- H_2O Destilada800 ml
- H_2SO_4 (1 N) q.s.p. para pH 1.8

Esterilizar em autoclave 20 minutos/120°C

Solução de Sulfato Ferroso

- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 33,3 g
- H_2O Destilada200 ml

Obs: antes de adicionar o sal na solução de Sulfato Ferroso , ajustar o pH com ácido sulfúrico (1 N) para 1,8. Esterilizar por membrana filtrante 0,45µ.

Deixar esfriar a solução de sais e misturar as duas soluções.

Para obtenção de meio sólido , utilizar agarose da Inlab (HSA 42°C - MR : 0,13 - Cod: 1740)

3.7.3 MEIO T&K MODIFICADO

- Solução de Sais800 ml
- Solução de Sulfato ferroso200 ml

Solução de Sais

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g
- K_2HPO_4 0,5 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$0,5 g
- H_2O Destilada800 ml
- H_2SO_4 (1 N) q.s.p. para pH 1.8

Esterilizar em autoclave 20 minutos/120°C

Solução de Sulfato Ferroso

- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 33,3 g
- H_2O Destilada200 ml

Obs: dissolver os sais da solução de sais e a de sulfato ferroso separadamente em água já acidulada com ácido sulfúrico (1 N) para 1,8. Esterilizar a solução de sulfato ferroso por membrana filtrante 0,45µm.

Deixar esfriar a solução de sais e misturar as duas soluções.

3.8 MÉTODO DE ENRIQUECIMENTO DE *Thiobacillus* DE LODOS DE ESGOTOS

Para a obtenção de uma solução enriquecida com bactérias do gênero *Thiobacillus* de lodos de esgoto, tentou-se adotar a metodologia utilizada por TYAGI et al.,(1992), que consistia basicamente em:

Alíquotas de 150ml de lodo são transferidas para erlenmeyers de 500 ml. O pH do lodo é ajustado para 4.0 com ácido sulfúrico 2N e adiciona-se 0,75g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ à cada frasco.

Os lodos para aclimação bacteriana são incubados à temperatura ambiente ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) sob agitação. Após a adaptação inicial, quando o potencial de óxido-redução alcançar 500 mV e o pH diminuir para 2.5 ou abaixo, 5% do lodo acidificado é misturado com 150 ml do lodo fresco correspondente contendo 0,5% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e incubado em seguida. Este passo é repetido até que o aumento do ORP (Potencial de óxido-redução) para 500 mV seja constante em 2 transferências consecutivas. Nesta fase, considera-se que os as bactérias estejam bem adaptadas (TYAGI et al, 1992).

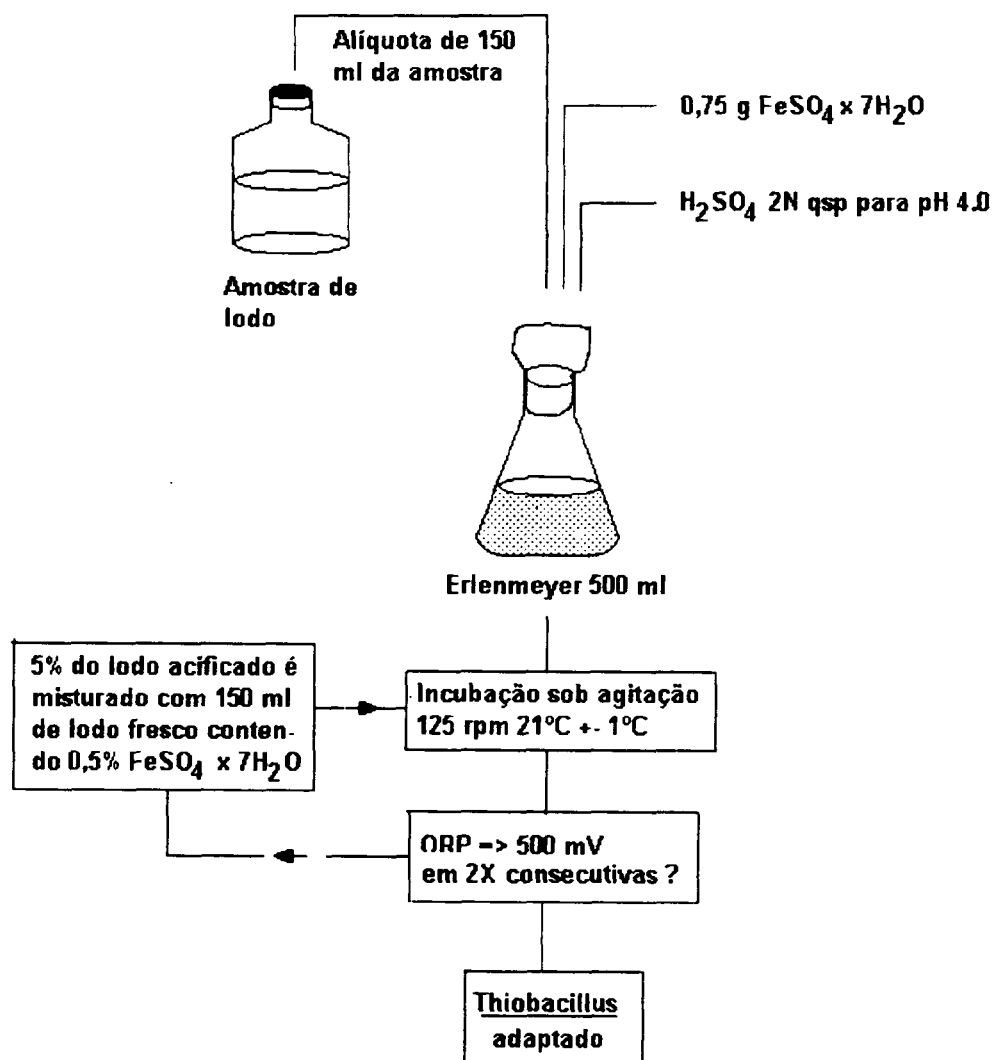
A presença de microrganismos oxidantes de Fe^{2+} nos lodos adaptados é constatada misturando-se 1 ml do lodo adaptado em 100 ml de meio 9K (pH 2.8) (item 3.7.1) contendo 44 g. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ por litro, preparado de acordo com LACEY & LAWSON (1970). As amostras são incubadas por 4 semanas. Se uma coloração vermelho-escura-marrom e/ou precipitado aparecer, a amostra é considerada positiva para a presença de bactérias oxidantes de Fe^{2+} . Duas amostras-controle são utilizadas (sem a adição de sulfato ferroso e outra com lodo esterilizado contendo 0,5% de sulfato ferroso) para distinguir-se entre a oxidação biológica e química do ferro.

Para determinar a capacidade de solubilização de metais das bactérias nativas oxidantes de ferro, um volume de 200 ml de cada lodo ajustado à pH 4.0 foi suplementado com 0.5% FeSO_4 e um inóculo à 5% (lodo adaptado) foi utilizado para os experimentos de lixiviação em frascos erlenmeyers de 500 ml. Amostras de 15 ml foram retiradas dos frascos a cada 2 dias para análises químicas. As amostras foram centrifugadas à $20.000 \times g$ por 15 minutos e os metais na porção líquida analisados.

Nesta metodologia, o tempo de incubação necessário para aumentar o potencial de óxido-redução (ORP) para 500 mV foi de 11 a 28 dias para todos os lodos. Após a adaptação, a

inoculação de cada lodo com a microflora oxidante de ferro (no lodo adaptado) precisou entre 2 a 10 dias para aumentar o ORP para 500 mV (Ver esquema na FIGURA 6)

FIGURA 6 - ESQUEMA DA METODOLOGIA ORIGINAL DE ENRIQUECIMENTO DE *TIOBACILUS* DE LODOS BIOLÓGICOS



Para as condições do trapaiho acima discutido, os autores determinaram que o potencial redox ideal para a máxima solubilização dos metais deveria ser de 450-500 mV.

Esta metodologia acima não dava as respostas esperadas, provavelmente devido ao alto teor de matéria orgânica deste lodo em específico, que fazia com que as leituras eletroquímicas

fossem muito instáveis, dificultando qualquer análise. Assim optou-se por uma modificação no método, na qual se centrifugou o lodo para que as partículas de matéria orgânica maiores se sedimentassem. Assim, procedeu-se da seguinte maneira:

3.8.1 MÉTODO MODIFICADO DE OBTENÇÃO DE UMA CULTURA ENRIQUECIDA DE *Thiobacillus*

- Centrifugou-se aproximadamente 40 ml da amostra de lodo (1000 rpm / 5 minutos) , retirando-se o sobrenadante.
- O sobrenadante foi diluído nas seguintes diluições: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , e incubado em meio T&K (pH 2,0) (item 3.7.23.7.2) sob agitação (27°C).
- Centrifugou-se o lodo a 1000 rpm por 5 minutos, somente para precipitação dos sólidos, fazendo com que somente a matéria orgânica solúvel se mantivesse, desfavorecendo o desenvolvimento de microrganismos que utilizassem este substrato.
- Retirou-se o sobrenadante e fez-se diluições em solução salina 0,85% 10^{-4} até 10^9 (volume final de 10ml) e adicionou-se estas diluições em 90 ml de meio T&K. Obtendo as diluições finais de 10^{-5} até 10^{-10} .

3.9 MÉTODO ELETROQUÍMICO COMO FORMA DE ACOMPANHAR A VELOCIDADE DE OXIDAÇÃO DO ÍON FERROSO A ÍON FÉRRICO NA PRESENÇA DE *Thiobacillus ferrooxidans*

O método oficial para se determinar a concentração do íon ferroso em solução é o da orto-fenantrolina (APHA et al. , 1992) e se baseia na formação do complexo colorido entre 3 moléculas de orto-fenantrolina com um átomo de íon ferroso, que é quantificado com um espectrofotômetro. Este método tem o inconveniente de não fornecer resultados imediatos, além de ser instrumentalmente mais exigente. PESIC et al., (1989) realizaram um trabalho mostrando que é possível se validar o método eletroquímico através do método oficial da orto-fenantrolina em soluções de sulfatos com oxigênio, na presença de *Thiobacillus ferrooxidans*, com a finalidade de se avaliar a atividade da bactéria. No trabalho deste grupo de pesquisa foram comparados dois sistemas de células eletroquímicas. A primeira célula formada por um eletrodo de trabalho de piritita e um eletrodo de referência de calomelano e a segunda por um eletrodo de trabalho de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Esta comparação foi realizada a fim de validar-se a célula eletroquímica que utiliza o eletrodo de platina, pois o eletrodo de piritita, apesar de ser o mais adequado para a medição da oxidação do íon ferroso a férrico, não está comercialmente disponível, e pode ser alterado no processo de medição. Estes autores concluíram que o eletrodo de platina se presta muito bem para o acompanhamento da oxidação do Fe^{2+} .

Para a checagem do correto funcionamento da célula eletroquímica, foram utilizadas duas soluções com potencial redox fixo, cuja composição é especificada na TABELA 6 e na TABELA 7

TABELA 6 - REAGENTES PARA PREPARO DA SOLUÇÃO-PADRÃO 234 MV

Solução-padrão 234 mV	
Ferrocianeto trihidratado de potássio	2,1 g.
Ferricianeto trihidratado de potássio	8,25 g.
Água destilada (q.s.p.)	500 ml

TABELA 7 - REAGENTES PARA PREPARO DA SOLUÇÃO 300 MV

Solução-padrão 300 mV	
Ferrocianeto trihidratado de potássio	2,1 g.
Ferricianeto trihidratado de potássio	8,25 g.
Fluoreto de potássio	16,95 g.
Água destilada (q.s.p.)	500 ml

3.10 MÉTODO DA 1,10 - FENANTROLINA PRA DETERMINAÇÃO DE Fe (II)

No contexto deste trabalho, este método foi utilizado para a validação do método eletroquímico no acompanhamento da cinética de oxidação do ferro II, e foi baseada nos trabalhos de PESIC et al., (1989)

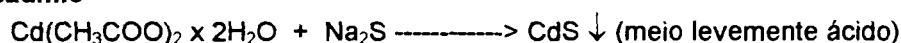
O Fe^{2+} reage com a 1,10 - Fenantrolina para formar o complexo de cor vermelho-alaranjado $[(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3\text{Fe}]^{2+}$. A intensidade da cor é independente da acidez no intervalo de pH de 2-9 e é estável por longos períodos. O Fe^{3+} pode ser reduzido com cloreto de hidroxilamônio ou com hidroquinona. Prata, bismuto, cobre, níquel e cobalto interferem seriamente, do mesmo modo perclorato, cianeto, molibdato e tungstato. O complexo de orto-fenantrolina ferroso (e o perclorato) pode ser extraído com nitrobenzeno, para a medida da absorbância em 515 nm contra um "branco".

Tanto o Fe^{2+} como o Fe^{3+} podem ser determinados espectrofotometricamente; o complexo de Fe^{2+} laranja - avermelhado absorve em 515 nm, e ambos os complexos de Fe^{2+} e de Fe^{3+} amarelo tem idêntica absorção em 396 nm, sendo as intensidades aditivas. A solução, levemente ácida por adição de ácido sulfúrico, é tratada com 1,10-fenantrolina e tamponada com hidrogenoftalato de potássio em pH de 3,9; a leitura em 396 nm dá o ferro total e em 515 nm dá o Fe^{2+} .

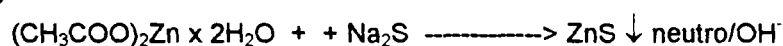
3.11 MÉTODO DE SÍNTESE DOS SULFETOS DE METAIS PESADOS

Como as amostras de lodo utilizadas não continham altas concentrações de metais pesados, foi necessária a contaminação artificial. Para isso foram sintetizados sulfetos dos metais pesados, que foram obtidos reagindo o acetato ou sulfato dos metais desejados com sulfeto de sódio (Na_2S). As reações para cada um dos 4 metais utilizados são as que se seguem:

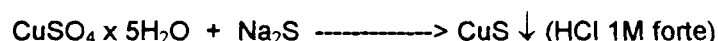
Sulfeto de cádmio



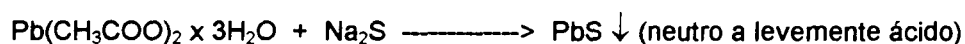
Sulfeto de Zinco



Sulfeto de Cobre



Sulfeto de Chumbo



Após a reação de precipitação, aquece-se a solução por 20 minutos, resfria-se e procede-se a filtração em papel de filtro qualitativo. É feita a "lavagem" do filtrado várias vezes com água deionizada até que o odor característico de ácido acético se dissipe. O filtrado é então colocado em estufa à 100 graus celsius para desidratação. É feita a raspagem dos sulfetos no papel de filtro e então moídos em almofariz de quartzo, para então serem utilizados.

3.12 MÉTODO DE ANÁLISE DE METAIS PESADOS

Foi utilizada a metodologia de análise de metais pesados preconizada pela CETESB - SP.

- Coleta-se uma alíquota de 50 ml de cada tratamento;
- Filtra-se com membrana de 0,45 μm . O filtrado vai em recipiente plástico diretamente para análise por espectrofotometria de absorção atômica;
- O material retido na filtração por membrana é colocado em bécker de 250 ml, e feito o ataque químico com 40 ml de água régia (ácido nítrico e ácido clorídrico na proporção 3:1), até que o volume se reduza para aproximadamente 40 ml;

- Após o ataque é feita a filtração para balão de 50 ml, e enviada análise por espectrofotometria de absorção atômica.

3.13 CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL

3.13.1 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DO LODO

Após a determinação da concentração dos metais pesados em vários lodos de esgoto disponíveis para estudo (ver sequência de tabelas a seguir, concluiu-se que a concentração nestes era baixa para o tipo de experimento pretendido, assim optou-se para a contaminação artificial com os sulfetos destes metais. Estes dados são resultado do projeto de destinação final do lodo de esgoto, conduzido pela Sanepar (Companhia de Saneamento do Paraná).

TABELA 8 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM - SANEPAR (CURITIBA, 1995)

Amostra	Cr	Zn	Pb	Ni	Cu	Hg	Cd
1001	180	757	115	95	473	nd	nd
1002	190	880	130	66	520	nd	nd
1003	165	837	127	72	454	2,4	nd
1004	175	855	140	68	440	1,9	nd
1005	183	790	102	68	310	1,6	nd
Média	178,6	824	123	73,8	439	1,18	

Obs: As amostras correspondem ao mesmo material coletado ao longo de 2 meses

FIGURA 7 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM - SANEPAR (CURITIBA, 1995)

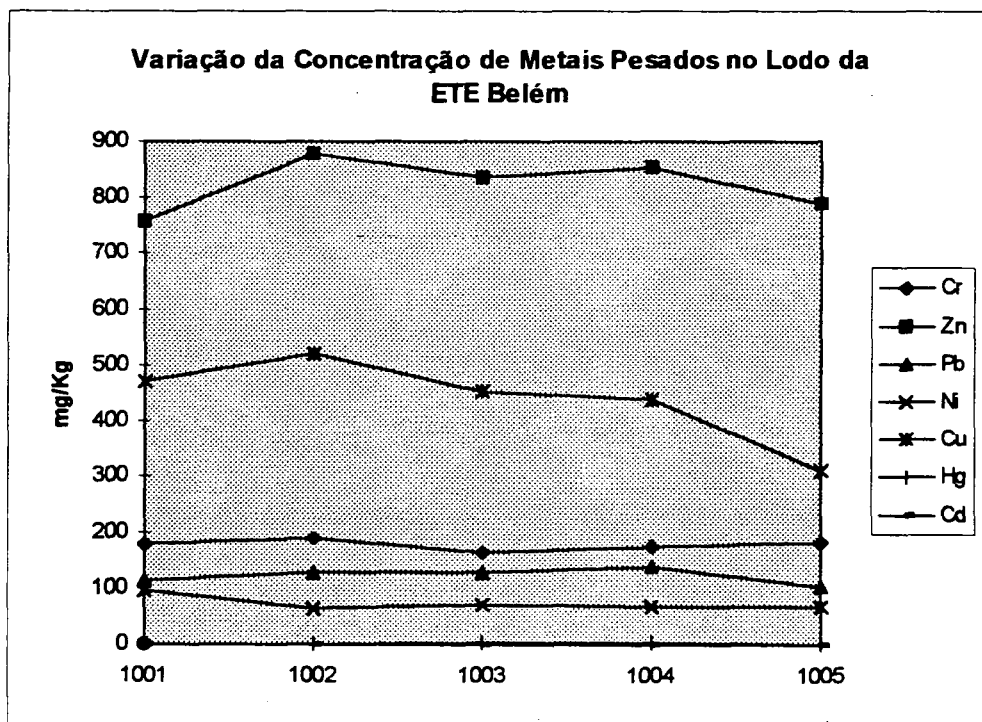


TABELA 9 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS (%) E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM

amostra	N total	P2O5	K2O	Ca	Mg	pH	Cinzas	P total	M.O total	C total	C/N	Umidade
1001	4,78	1,67	0,36	1,03	0,34	5,6	30,2	3,47	58,5	32,5	7:01	11,3
1002	5,82	2,81	0,46	1,22	0,45	5,9	35,6	3,92	63,2	35,1	6:01	1,16
1003	6,36	2,43	0,65	1,04	0,35	5,6	27,8	3,45	69,2	38,5	6:01	2,92
1004	6,64	2,69	0,42	1,07	0,42	5,8	27,7	3,71	69,9	38,8	6:01	2,4
1005	5,98	2,68	0,66	1,18	0,37	5,8	25,4	3,84	66,3	36,8	6:01	8,75
Média	5,916	2,46	0,51	1,11	0,39	5,74	29,34	3,678	65,42	36,34	6:01	5,306

Obs: As amostras correspondem ao mesmo material coletado ao longo de 2 meses

FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DE GRÁFICOS MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO AERÓBIO DA ETE - BELÉM

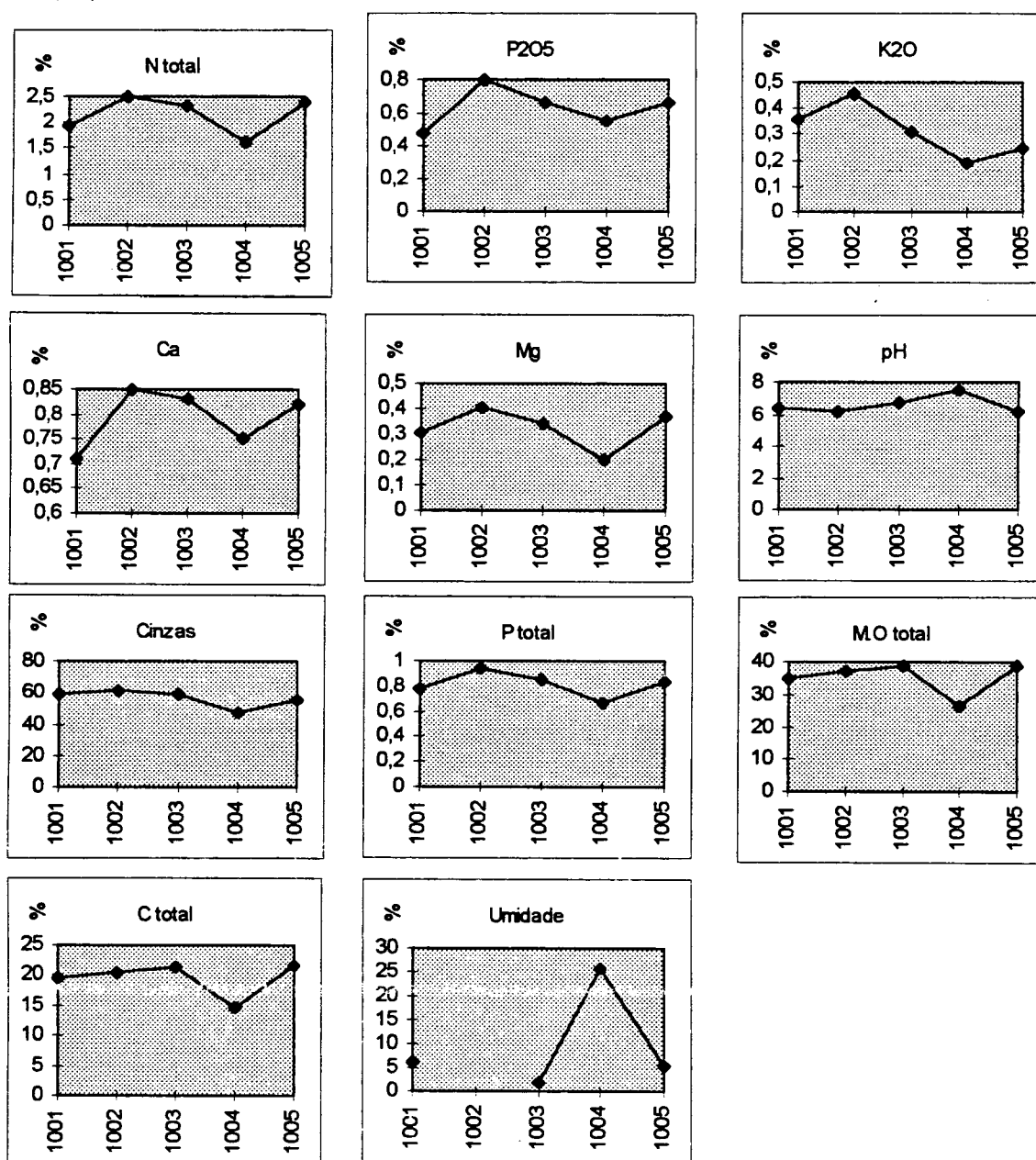


TABELA 10 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODOANAERÓBIO DE RALF'S (REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO)

Amostra	Cr	Zn	Pb	Ni	Cu	Hg	Cd
1001	58	415	60	41	71	nd	nd
1002	55	475	65	36	82	1,7	nd
1003	68	430	60	45	83	nd	nd
1004	40	465	70	40	120	0,8	nd
1005	71	495	65	40	90	nd	nd
média	58,4	456	64	40	89	0,5	

Obs: As amostras correspondem ao mesmo material coletado ao longo de 2 meses

FIGURA 9 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS NO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO)

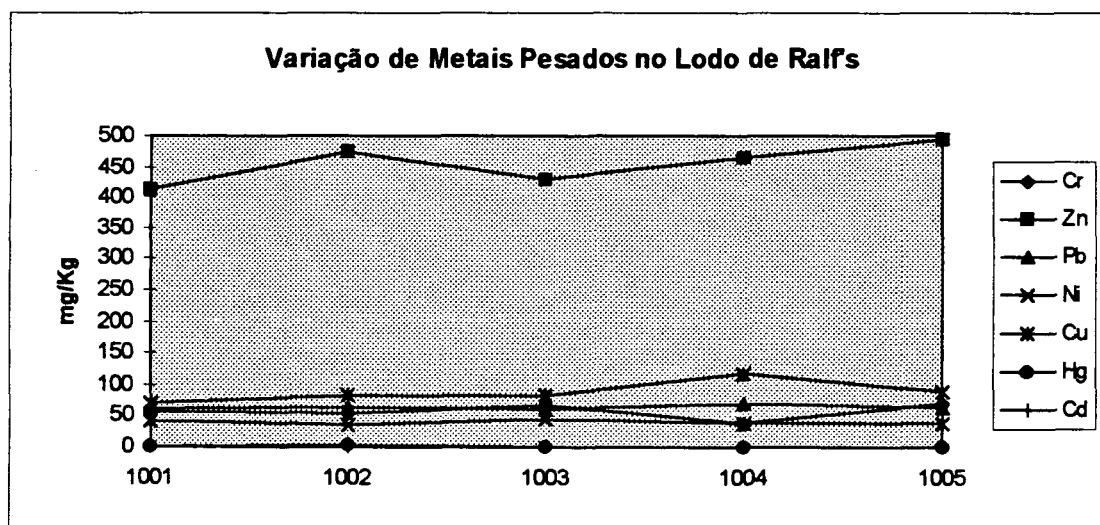
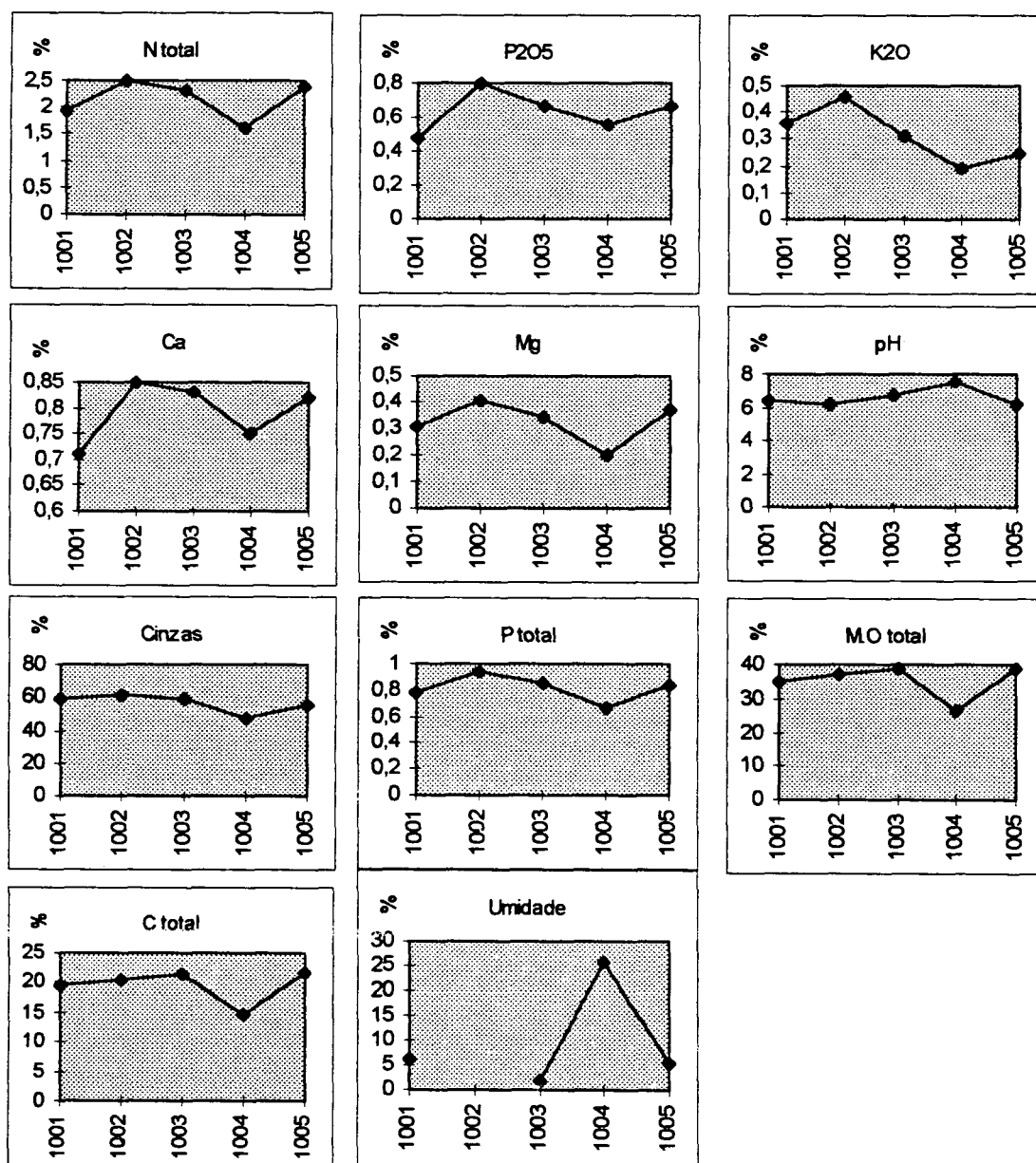


TABELA 11 - VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO)

Amostra	N total	P2O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	pH	Cinzas	P total	M.O total	C total	C/N	Umidade
1001	1,92	0,48	0,36	0,71	0,31	6,4	58,6	0,78	35,1	19,5	10:01	6,2
1002	2,5	0,8	0,46	0,85	0,41	6,2	61	0,94	37	20,5	8:01	
1003	2,32	0,67	0,31	0,83	0,34	6,8	59,5	0,86	38,6	21,4	9:01	1,78
1004	1,61	0,55	0,19	0,75	0,2	7,5	48,1	0,66	26,2	14,5	9:01	25,7
1005	2,4	0,67	0,25	0,82	0,37	6,2	55,7	0,84	38,8	21,5	9:01	5,43
média	2,15	0,63	0,31	0,79	0,326	6,62	56,58	0,816	35,14	19,48		7,822

Obs: As amostras correspondem ao mesmo material coletado ao longo de 2 meses

FIGURA 10 - SEQUÊNCIA DE GRÁFICOS MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACROELEMENTOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LODO ANAERÓBIO DE RALF'S (REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO)



Devido a concentração baixa, optou-se pela contaminação artificial do lodo por sulfetos metálicos pelos seguintes motivos:

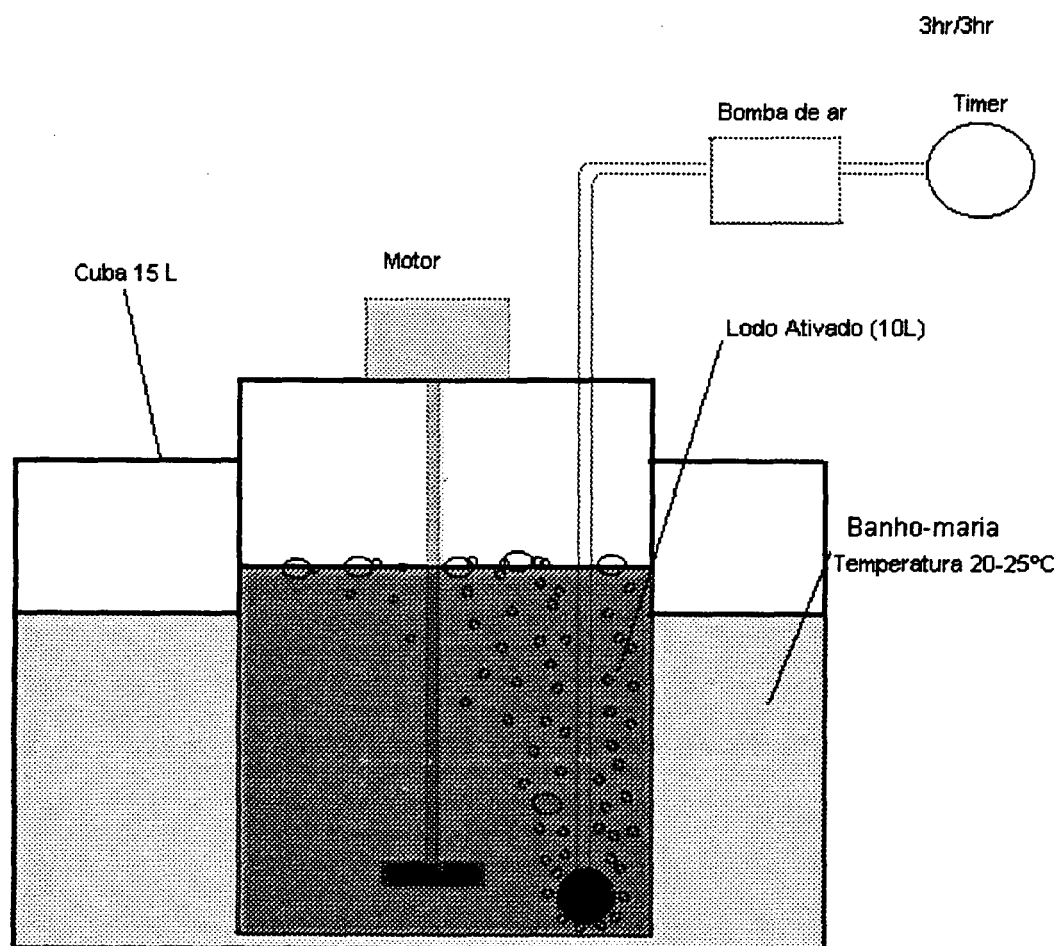
- A eficiência ou não do processo de biolixiviação poderia ser comprovada com mais clareza, não ficando mascarada pela sensibilidade do instrumento analítico utilizado (Absorção atômica ou ICP Plasma) ou pela margem de erro maior inerente à baixas concentrações ;
- A fração dos metais que interessaria que fosse afetada no processo seria exatamente a insolúvel, que se precipita junto com o lodo na forma de sulfetos metálicos
- O mecanismo de ação das bactérias do gênero *Thiobacillus*, se baseia principalmente na ação em cima de sulfetos;

3.14 LODO ARTIFICIAL

A metodologia de cultivo do lodo artificial foi utilizada somente para obtenção de um lodo estável para a realização dos experimentos de biolixiviação, evitando assim a variação inerente à coletas em diferentes condições, facilitando a comparação dos resultados. A metodologia original (DAZAI 1980) recomenda cultivar o lodo artificial usando uma solução nutriente contendo glucose (33.33g/L); Polipeptona (33,33g/L) e Fosfato de potássio (3.3 g/L). Durante o experimento as seguintes tarefas tem que ser feitas diariamente:

- Parar a aeração e esperar 30 minutos para que o lodo se decante no fundo;
- Descartar o sobrenadante e completar no mesmo nível com água de torneira;
- Adicionar 100 ml do substrato (Solução Nutriente);
- Alternação de fases aeróbias e anaeróbias (3 horas de aeração com baixa agitação e 3 horas de baixa agitação somente).

FIGURA 11 - ESQUEMA DE CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL



obs:

- É necessário o uso de água de torneira, pois fornece microelementos necessários ao crescimento bacteriano;

Após a discussão deste método, concluímos que para os propósitos de biolixivação as seguintes modificações seriam adequadas:

- Uso de aeração contínua ao invés de alternância de fases aeróbias/anaeróbias;

- Após o período de pré-cultivo (aproximadamente 1 mês) os sulfetos de metais pesados são adicionados e se tomam estáveis (quanto à concentração) por aproximadamente 1 semana a 10 dias;

Para se comprovar a estabilidade do lodo, faz-se diariamente o cálculo do IVL (Índice Volumétrico do Lodo), obtido da seguinte forma:

$$IVL = \frac{SD_{30}}{SSV_{ta}} = \frac{ml/L}{g/L} = mL/g$$

Onde:

SD_{30} = Decantação do lodo após 30 minutos (ml/l)

SSV_{ta} = Sólidos em Suspensão no tanque de aeração

O SSV_{ta} é obtido da seguinte forma:

- Uma membrana de fibra de vidro é seca 1 hora à 110C;
- A membrana é resfriada em um dessecador e pesada;
- uma alíquota de lodo de 10 ml é filtrada através desta membrana;
- Seca-se a membrana por 2 horas à 110 C;
- Pesa-se a membrana novamente e através da diferença de peso o SSV_{ta} é calculado.

Com o acompanhamento diário deste parâmetro, é possível detectar quando o lodo se tornou estável quanto ao seu teor de sólidos e quanto à velocidade de decantação.

3.15 CONFIRMAÇÃO DE ESPÉCIE

As biohidrometalurgia utiliza como provas de identificação da presença de *Thiobacillus ferrooxidans*, somente a comprovação da característica acidofílica (crescimento em pH 2,0), e crescimento em meio inorgânico, tendo o ferro como fonte de energia (à partir da oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+}) (ROSSI, 1990)

3.16 EXPERIMENTO DE BIO-LIXIVIAÇÃO

Para a realização deste experimento foram utilizadas cubas de 2,5 L contendo 1 litro de lodo padronizado pelo método de cultivo de lodo artificial (Ver item 3.13 - CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL, pág. 56). Este experimento teve a duração de três dias.

Foram utilizados 4 tratamentos, descritos a seguir:

3.17 DESCRIÇÃO

3.17.1 TRATAMENTO 1 (T1)

Controle negativo, contendo somente o lodo obtido pelo método de cultivo artificial.

Este tratamento objetiva monitorar as alterações no lodo utilizado no experimento dentro das mesmas condições do experimento

3.17.2 TRATAMENTO 2 (T2)

Lodo com pH corrigido para 4,0 (com H_2SO_4 1N), mais sulfetos de metais pesados.

Neste tratamento pretende-se descontar qualquer possível lixiviação química que ocorra com a adição de ácido sulfúrico para correção do pH.

3.17.3 TRATAMENTO 3 (T3)

Lodo com pH corrigido para 4,0 (com H_2SO_4 1N), mais sulfetos de metais pesados, mais sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Este tratamento tem o mesmo objetivo do anterior, porém verificando se a adição de sulfato ferroso afetaria também na lixiviação química.

3.17.4 TRATAMENTO 4 (T4)

Lodo com pH corrigido para 4,0 (com H_2SO_4 1N), mais sulfetos de metais pesados, mais sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), mais inóculo do Isolado de *Thiobacillus ferrooxidans* (100 ml cultivado em meio T&K 5 dias).

Neste último tratamento é que ocorreria o processo de biolixiviação.

3.17.5 VARIÁVEIS MONITORADAS

Para que pudéssemos obter resultados conclusivos neste experimento, foi necessário que os seguintes parâmetros fossem monitorados:

- Potencial de óxido-redução: foi feita a medição de cada tratamento a cada 24 horas
- pH: foi feita a medição de cada tratamento a cada 24 horas
- Sólidos totais: Feita a determinação no início e no final do tratamento.
- Concentração dos metais estudados na fração solúvel e insolúvel dos 4 tratamentos, do início e do final do experimento.
- Concentração de micro e macroelementos no lodo original e no lodo após o processo de bio-lixiviação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO ELETROQUÍMICO

O método eletroquímico adotado (Vide item 3.9-, pag.53) mostrou ser adequado para o monitoramento da atividade de oxidação do íon ferroso pelas bactérias ferro oxidantes.

Como pode-se constatar que entre uma medição e outra do potencial redox dos meios de cultivo onde eram incubados as bactérias, a utilização de uma solução de hipoclorito de sódio 40% foi eficiente na prevenção de contaminação cruzada.

A adoção das soluções-padrão 234 mV e 300 mV (Tabela 6 e Tabela 7) para verificação do funcionamento correto do sistema de medição eletroquímico foi de grande valia, pois foi possível se estabelecer um procedimento de checagem antes de cada medição. As soluções se mostraram estáveis ao longo do tempo do experimento, não sendo necessária a preparação de novas soluções. A seguir estão colocadas as leituras destes padrões ao longo do tempo (FIGURA 12):

FIGURA 12 - LEITURAS ELETROQUÍMICAS DAS SOLUÇÕES-PADRÃO DE CALIBRAÇÃO

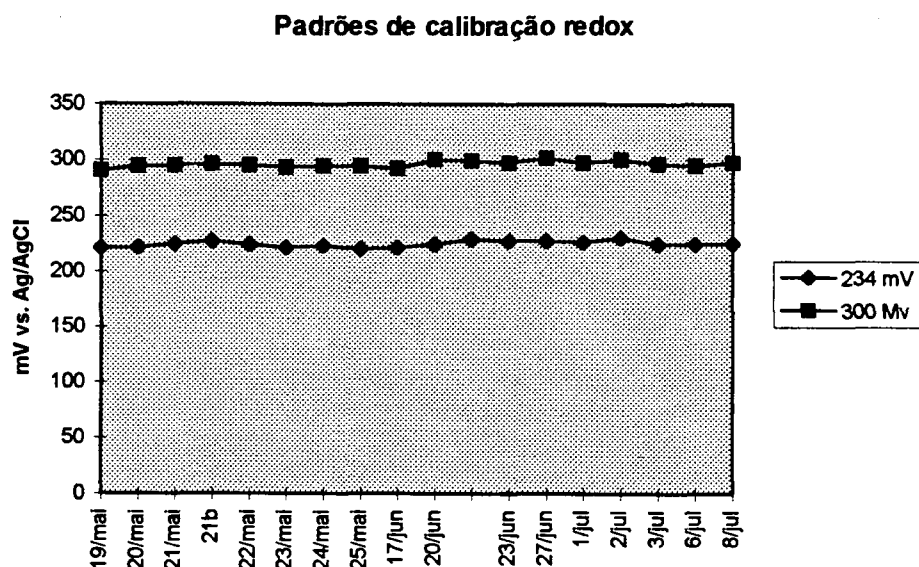


TABELA 12 - LEITURAS ELETROQUÍMICAS DAS SOLUÇÕES-PADRÃO DE CALIBRAÇÃO

Dia	234 mV	300 Mv
19/mai	221	290
20/mai	222	294
21/mai	225	295
21b	227	296
22/mai	224	295
23/mai	221	293
24/mai	223	294
25/mai	220	294
17/jun	221	292
20/jun	224	300
	229	299
23/jun	227	297
27/jun	227	301
1/jul	226	297
2/jul	230	300
3/jul	224	296
6/jul	224	294
8/jul	225	297

4.2 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

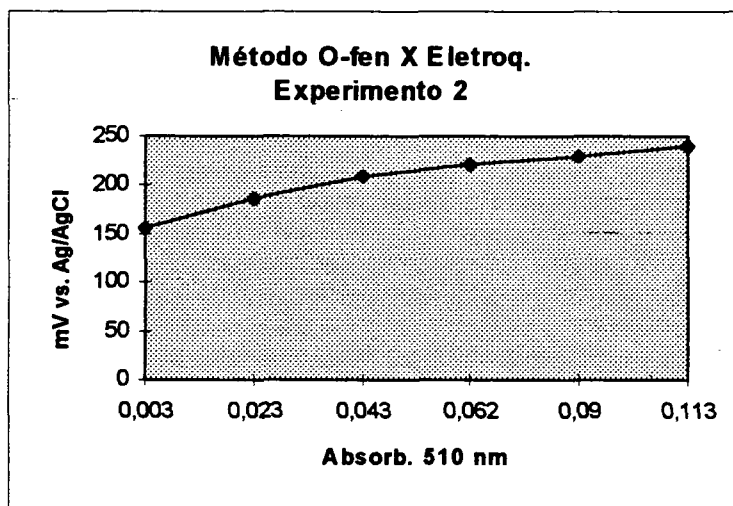
Este método, discutido no item "3.10 - MÉTODO DA 1,10 - FENANTROLINA PARA DETERMINAÇÃO DE Fe (II), pag. 54" foi importante no processo de validação do método

eletroquímico, pois a partir deste, pode-se obter resultados de correlação entre os resultados destes dois métodos.

Foram necessárias várias tentativas para se assimilar e utilizar este método. A seguir são enumerados os aspectos de maior relevância na sua utilização:

- É necessário um excesso de 1,10 fenantrolina para que ocorra o desenvolvimento da cor.
- Tomar cuidado com a exposição excessiva a luz solar, sendo recomendado que se proteja o balão volumétrico com papel alumínio.
- Não deve ser feita a adição do tampão às soluções que forem utilizadas para leituras eletroquímicas, pois o mesmo "estabiliza" as leituras.

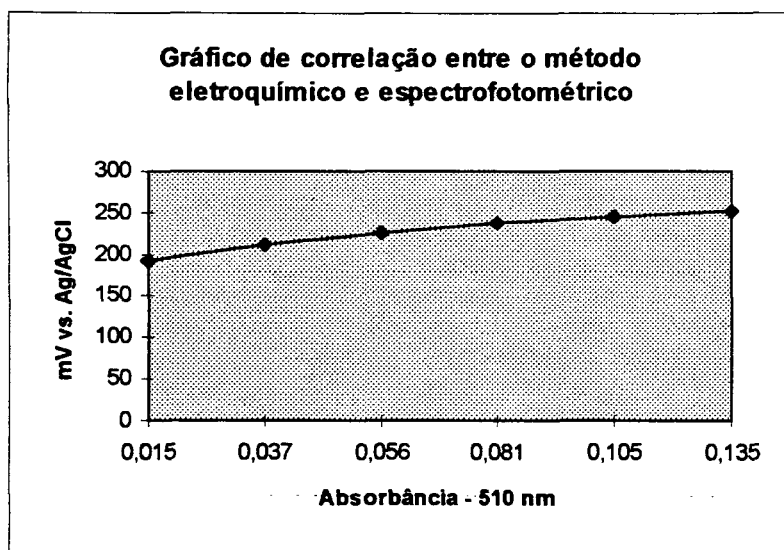
FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO ELETROQUÍMICO E O ESPECTROFOTOMÉTRICO



	Absorb.	redox
0	0,003	156
10	0,023	187
20	0,043	208
30	0,062	221
40	0,09	229
50	0,113	240

($r = 0,9978$ para absorção e $r =$ para leitura eletroquímica)

TABELA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO ELETROQUÍMICO E O ESPECTROFOTOMÉTRICO - REPETIÇÃO



Conc.	Abosrb.	Redox
0	0,015	192
10	0,037	211
20	0,056	226
30	0,081	237
40	0,105	246
50	0,135	252

4.3 LODO ARTIFICIAL

Com este método, discutido no item 3.13 "CULTIVO DO LODO ARTIFICIAL, pag. 56", foi possível se obter um lodo estável ao longo dos experimentos, possibilitando uma melhor comparação de resultados.

4.4 ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DE *Thiobacillus ferrooxidans*

4.4.1 MÉTODO MODIFICADO DE OBTENÇÃO DE UMA CULTURA ENRIQUECIDA DE *Thiobacillus ferrooxidans*

A sequência de gráficos e tabelas a seguir mostra o comportamento eletroquímico da cultura enriquecida, dando uma idéia do comportamento, quanto à oxidação do ferro, ao longo do tempo.

FIGURA 14 - PRIMEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

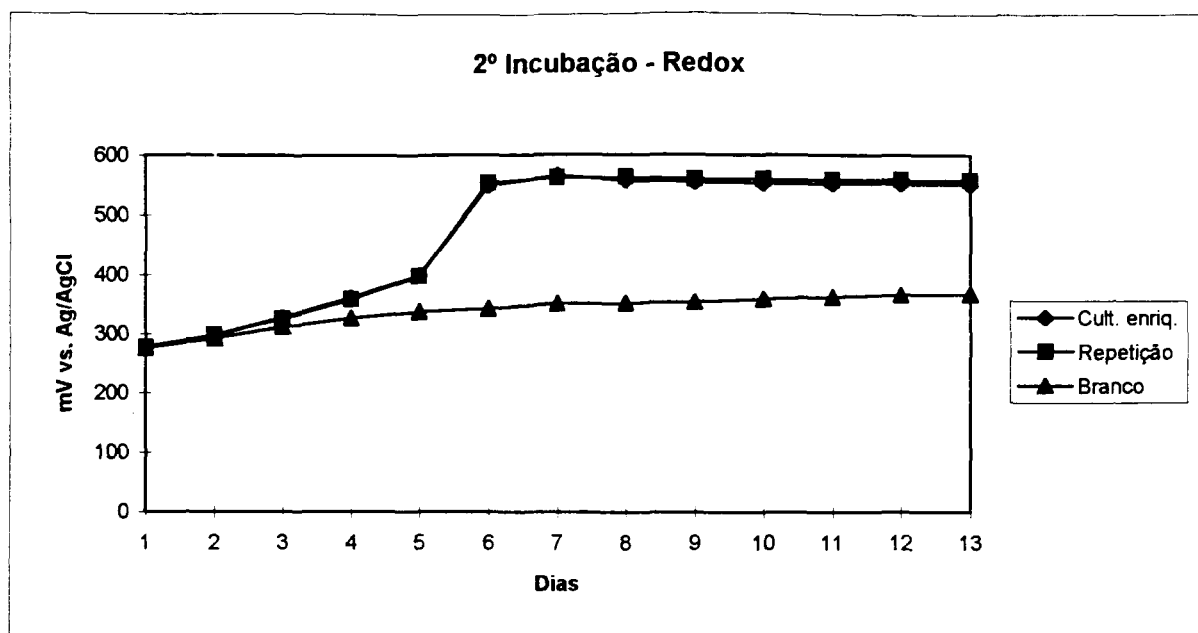


TABELA 14 - PRIMEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

Tempo	Cepa enriq.	Repetição	Branco
1	278	277	276
2	297	298	292
3	327	325	311
4	361	358	326
5	398	397	337
6	549	554	342
7	565	562	351
8			
9	558	564	352
10	555	560	354
11	554	560	359
12	553	559	362
13	552	559	365
14	551	558	367

Nesta segunda incubação, pode se observar bem a diferença na resposta entre o branco e os erlenmeyers com o inóculo. A maior velocidade de oxidação do ferro se dá a partir do 4º dia, se estabelecendo em seguida, devido à exaustão do íon ferroso.

FIGURA 15 - SEGUNDO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

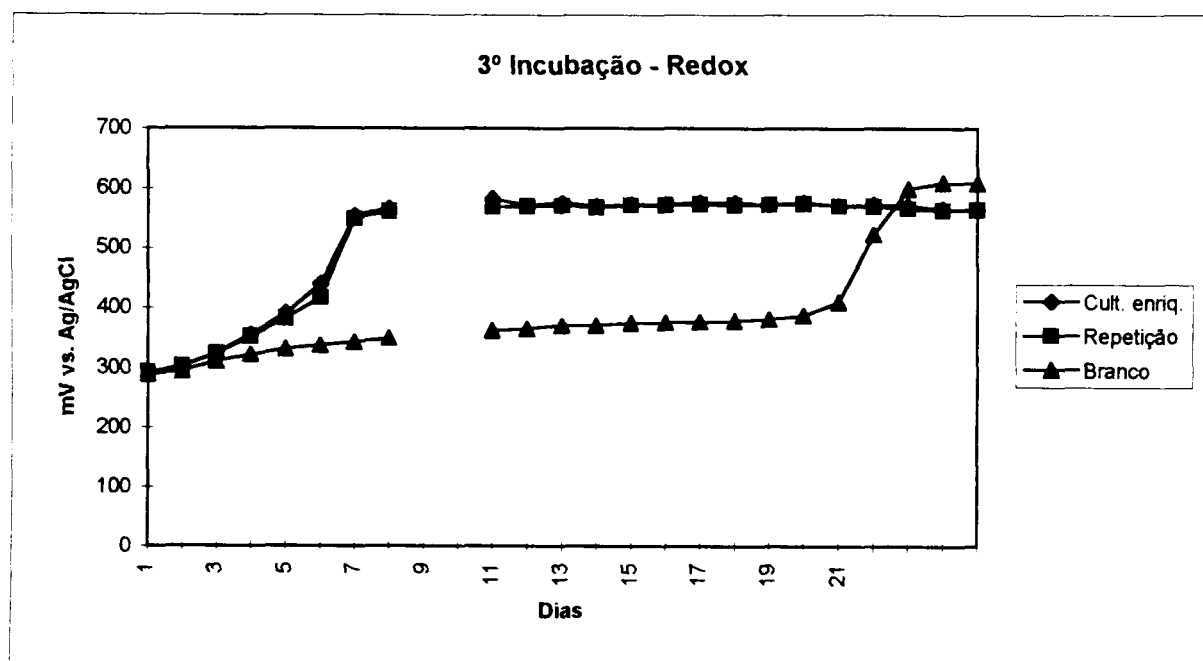


TABELA 15 - SEGUNDO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

Tempo	Lodo	Repetição	Branco
1	292	292	288
2	302	302	294
3	324	323	310
4	355	351	322
5	390	382	331
6	439	416	337
7	554	548	342
8	565	561	349
9			
10			
11	583	568	361
12	571	569	364
13	575	570	369
14	569	567	369
15	573	571	374
16	573	572	375
17	576	573	376
18	576	572	378
19	573	573	380
20	576	574	387
21	571	570	409
22	573	569	522
23	571	565	599
24	565	563	610
25	564	564	608

Aqui também mais uma vez se repete o aumento na velocidade de oxidação do íon ferroso à partir do 4º dia. A partir do 20º dia ocorreu a contaminação do branco, fazendo com que ocorresse resposta semelhante no branco. Nesta fase ainda se utilizava o álcool como desinfetante do eletrodo. Após discussão deste procedimento na apresentação dos resultados no laboratório, chegou-se à conclusão que o hipoclorito de sódio é o desinfetante mais recomendado.

FIGURA 16 - TERCEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

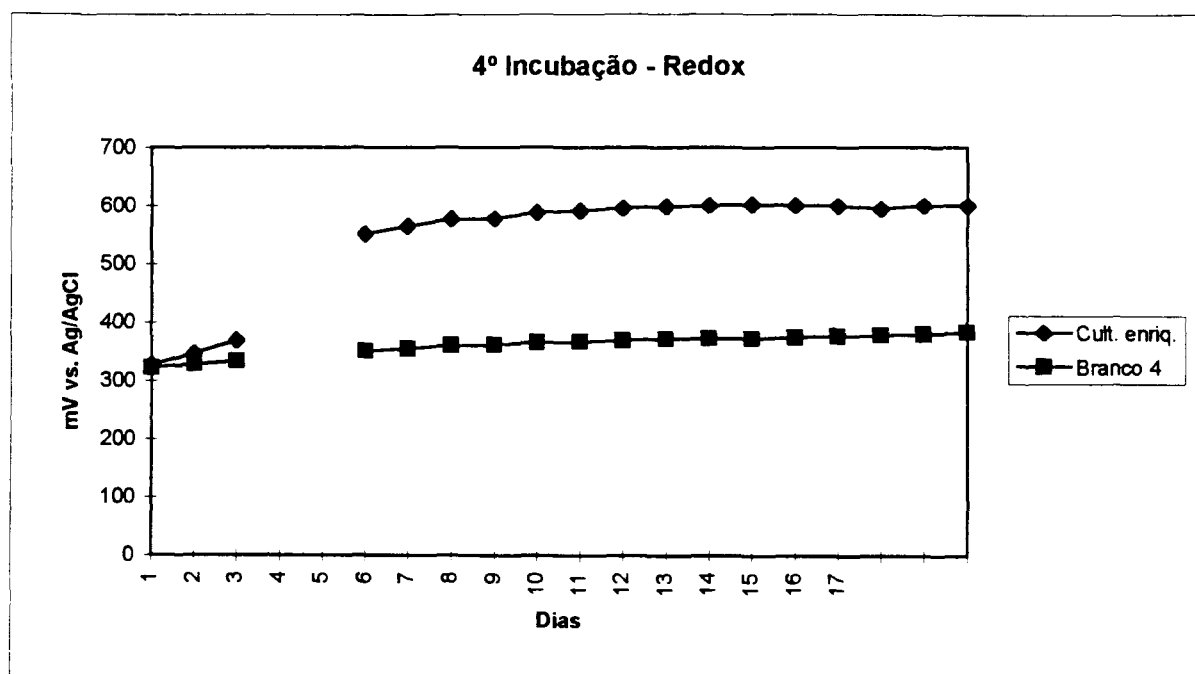


TABELA 16 - TERCEIRO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

Tempo	Cult. enriq.	Branco
1	327	322
2	347	329
3	369	334
4		
5		
6	552	351
7	565	355
8	577	360
9	578	362
10	588	366
11	592	368
12	596	369
13	599	372
14	601	373
15	603	373
16	601	375
17	600	377
18	594	379
19	600	381
20	600	384

Comportamento semelhante à segunda incubação, onde estima-se também que o aumento da velocidade de oxidação se deu após o quarto dia.

FIGURA 17 - QUARTO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

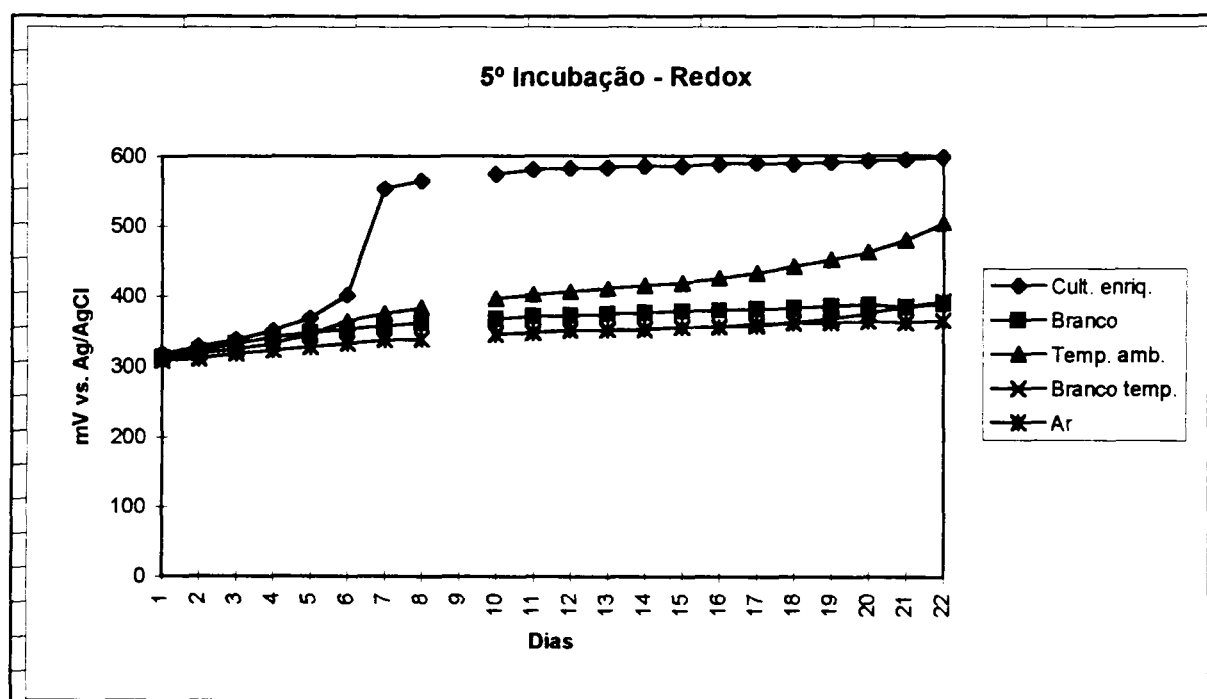


TABELA 17 - QUARTO REPIQUE DA CULTURA DE TIOBACILUS ENRIQUECIDA À PARTIR DO LODO - LEITURAS ELETROQUÍMICAS

Tempo	Cult. enriq.	Branco	Temp. amb.	Branco Temp.	Ar
1	319	313	314	308	308
2	329	323	319	312	311
3	338	333	325	318	318
4	351	341	332	323	323
5	369	348	345	327	327
6	402	353	364	333	333
7	553	357	375	337	337
8	565	362	383	339	339
9					
10	574	367	396	345	345
11	580	371	402	348	347
12	582	372	406	350	351
13	583	374	410	351	352
14	585	376	414	352	353
15	585	378	418	355	355
16	588	379	425	356	355
17	589	381	432	360	357
18	588	382	441	362	361
19	590	385	451	367	362
20	592	387	462	375	363
21	594	383	479	384	362
22	598	389	503	391	364

4.4.2 MEIO DE CULTURA

Dos meios de cultura líquidos recomendados pela bibliografia para crescimento de *Thiobacillus ferrooxidans*, o meio T&K (TUOVINEN & KELLY, 1973) modificado apresentou o melhor resultado, tanto na facilidade de preparo, como na resposta de crescimento. O pH 1,8 deste meio previne a precipitação do ferro II.

O meio 9K (SILVERMAN & LUNDGREEN, 1959), também recomendado para o cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*, foi utilizado somente no início dos experimentos.

4.5 SÍNTESE DOS SULFETOS DE METAIS PESADOS

Como houve uma discrepância nas concentrações de metais pesados obtidas no experimento de biolixiviação, foi feita a determinação da pureza dos sulfetos obtidos através da pesagem de 0,1 g de cada sulfeto em um bécker único, feito o ataque com água régia e determinada a concentração com absorção atômica. Foram obtidas os seguintes resultados:

Tabela 18 - Determinação da Pureza dos Sulfetos de metais sintetizados

Elemento	Conc. Esperada (PPM)	Conc. Obtida (PPM)	Pureza (%)
Cobre	665	550	83
Cádmio	778	550	71
Zinco	671	550	82
Chumbo	866	750	87

4.6 BIO-LIXIVIAÇÃO

No processo de bio-lixiviação, puderam ser observados os seguintes aspectos :

- A atuação bacteriana que realizou a bio-lixiviação;
- Ao contrário do esperado, não houve inibição da população microbiana heterótrofa após a adição dos sulfetos de metais pesados.
- Boa eficiência do processo de solubilização dos metais

Tabela 19 - Valores do Potencial de óxido-redução (mV) monitorados ao longo do experimento de biolixiviação

Tratamento	1º dia	2º dia	3º dia
1	382	330	302
2	299	280	272
3	238	249	238
4	257	238	239

Tabela 20 - valores de pH monitorados ao longo do experimento de biolixiviação

Tratamento	1º dia	2º dia	3º dia
1	4,43	4,43	5,16
2	6,56	6,22	6,94
3	5,22	5,14	5,15
4	5,00	5,02	5,08

Na Tabela 19, ao contrário do esperado, houve um decréscimo no potencial redox ao longo dos 3 dias do experimento, assim como o pH (Tabela 20) que após a correção para pH 4,0 subiu. Isto se deve provavelmente ao alto teor de matéria orgânica, que fez com que ocorresse um fenômeno de tamponamento do pH.

Tabela 21 - Determinações da concentração de metais pesados no experimento de biolixiviação - Tratamento 1 (somente lodo)

Elemento	Início		Fim	
	solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)	Solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)
Pb	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Cd	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Zn	< 0,010	1,0	< 0,010	1,0
Cu	< 0,05	0,63	< 0,050	0,60
Ni	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,10
Fe	0,30	51	< 0,10	49,0
Cr	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,1

No tratamento 1(somente lodo), pode-se constatar que as concentrações de metais estavam a níveis bem baixos, tanto na fração solúvel como na insolúvel.

Tabela 22 - Determinações da concentração de metais pesados no experimento de biolixiviação - Tratamento 2 (Lodo + metais pesados)

Elemento	Início		Fim	
	solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)	Solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)
Pb	< 0,5	145	< 0,5	147,5
Cd	< 0,05	9,0	< 0,05	7,0
Zn	37	775	2,0	775,0
Cu	< 0,05	175	< 0,050	175,0
Ni	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,10
Fe	< 0,1	50	< 0,10	50,0
Cr	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,1

Neste tratamento (tratamento 2 - Lodo + metais pesados), pudemos observar os metais se apresentavam na forma insolúvel no início do tratamento como no final.

Tabela 23 - Determinações da concentração de metais pesados no experimento de biolixiviação - Tratamento 3 (Lodo + metais pesados + Ácido sulfúrico (pH 4,0 + Sulfato ferroso)

Elemento	Início		Fim	
	solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)	Solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)
Pb	< 0,5	135	< 0,5	132,5
Cd	< 0,05	9,0	< 0,05	9,0
Zn	600	450	650	475,0
Cu	< 0,05	175	0,09	150
Ni	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,10
Fe	575	142,5	215	375,0
Cr	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,1

Neste tratamento (tratamento 3 - Lodo + metais pesados + ácido sulfúrico (pH 4,0) + sulfato ferroso), pode se observar que o chumbo, cádmio e cobre permaneceram insolúveis tanto no início como no final do tratamento. O zinco se solubilizou acima de 50% logo após a adição de ácido sulfúrico, e permanecendo neste nível até o final do tratamento, mostrando que para este elemento a adição de ácido já é suficiente para ocorrer a solubilização.

Tabela 24 - Determinações da concentração de metais pesados no experimento de biolixiviação - Tratamento 4 (Lodo + Metais pesados + Ácido Sulfúrico (pH 4,0) + Sulfato ferroso + inóculo de *Thiobacillus ferrooxidans*)

Elemento	Início		Fim	
	solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)	Solúvel (ppm)	Insolúvel (ppm)
Pb	< 0,5	125	107,5	< 0,05
Cd	0,18	9,0	8,0	< 0,5
Zn	725	300,0	375,0	375,0
Cu	< 0,05	150,0	125,0	< 0,050
Ni	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,10
Fe	825	425,0	525,0	525,0
Cr	< 0,1	< 0,1	< 0,10	< 0,1

Neste tratamento (Tratamento 4 - Lodo + metais pesados + ácido sulfúrico (pH 4,0) + sulfato ferroso + *Thiobacillus*), pode-se observar que no início do tratamento os metais se encontravam na forma insolúvel, com exceção do zinco, que como comprovado através do tratamento 3, já havia se solubilizado somente com o abaixamento do pH. E no final do tratamento, o chumbo, cádmio e cobre haviam se solubilizado, estimando-se a eficiência de biolixiviação em torno de 90%. Com exceção do zinco que teve 50% de sua fração na parte insolúvel e a outra metade na fração solúvel.

Ao contrário da biohidrometalurgia, que trabalha a biolixiviação em condições inorgânicas, a lixiviação em lodo se realiza sob condições bem diferentes, possuindo alto teor de material orgânico (solúvel e insolúvel). Esta condição fez com que aparentemente se alterassem os mecanismos, e entrassem em jogo outras variáveis. Os dados do experimento mostram que a biolixiviação ocorreu de fato, mas não seguindo as mesmas vias que ocorrem na biohidrometalurgia, pois ocorreu a diminuição do potencial de óxido-redução e aumento do pH, enquanto era esperado um comportamento oposto (Aumento do potencial redox e diminuição do pH). Isto sugere uma provável solubilização dos metais pesados através da sua interação com a fração solúvel da matéria orgânica, que solubilizaria estes elementos. É importante destacar que qualquer que seja o mecanismo de biolixiviação envolvido, o microrganismo *Thiobacillus ferrooxidans* teve atuação fundamental, pois sem este, a solubilização não ocorria.

Na Tabela 25 estão esquematizados os dados referentes às propriedades fertilizantes do lodo. É importante ressaltar, que no caso do seu aproveitamento agrícola, este é adensado ainda cerca de 15 a 20 vezes, e feita a calagem, assim estas concentrações seriam pelo menos 15 vezes maiores.

Tabela 25: Determinações físico-químicas das propriedades fertilizantes do lodo

	N total	P total	K	Ca	pH	Umidade	MO	C total	C/N	Cinzas
Tratamento	g/100	(g/100	solúvel	(g/100		%	(g/100	(g/100		(g/100
	mg	mg)	(g/100	mg)			mg)	mg)		mg)
			mg)							
1	0,23	0,037	0,081	0,0032	5,3	97,8	0,58	0,32	1:01	5,3
2	0,22	0,037	0,067	0,003	6,5	97,8	0,41	0,22	1:01	6,8
3	0,21	0,053	0,09	0,004	5,4	97,9		0,36	2:01	11,9
4	0,21	0,085	0,126	0,0058	5,3	96,5	1,1	0,61	3:01	13,4
L.A.*	0,26	0,048	0,109	0,0033	5,7	97,2	0,56	0,31	1:01	4,8

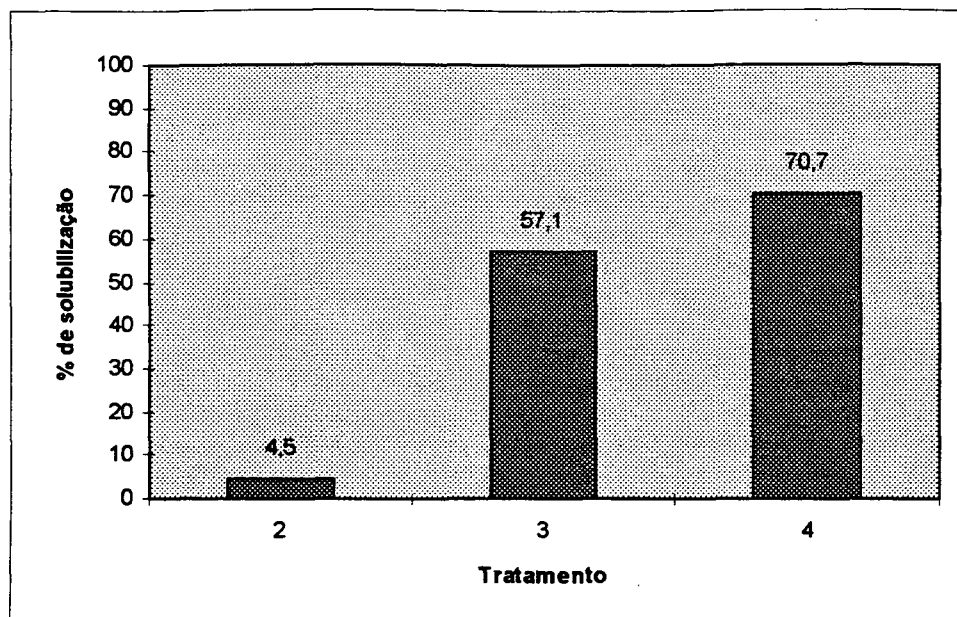
* L.A. - Lodo Artificial

Ao compararmos os valores do tratamento 4 com o L.A. - Lodo artificial, que é o lodo que foi utilizado no experimento, mas que continuou recebendo nutrientes (lodo do tratamento 1 é o mesmo, só que durante os 3 dias do experimento não recebeu nutrientes), teremos um parâmetro para compararmos se o processo de bio-lixiviação de metais pesados lixivia também os elementos que tomam o lodo um bom fertilizante agrícola. Assim, ao compararmos o Tratamento 3 com o 4, não observamos alterações significativas.

Comportamento do zinco

O zinco foi o elemento que apresentou uma resposta diferenciada dos outros sulfetos estudados, já apresentando solubilizações diferenciadas nos inícios dos tratamentos 2, 3 e 4, como mostrado na FIGURA 18.

FIGURA 18 - PORCENTAGENS DE SOLUBILIZAÇÃO DO ZINCO NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS



A solubilidade crescente nos tratamentos 2, 3 e 4 se deve ao favorecimento, também crescente, das condições ótimas de lixiviação (pH mais ácido e presença do íon férrico)

A maior solubilidade do sulfeto de zinco no início dos tratamentos acima citados pode ser explicada pelo seu produto de solubilidade (Kps), que é o maior, em relação ao Kps dos outros sulfetos estudados (Tabela 26), ou seja a solubilidade do sulfeto de zinco é a maior do que todos os outros avaliados, fazendo com que já ocorra a lixiviação no início do processo.

Tabela 26 - PRODUTOS DE SOLUBILIDADE (Kps) DOS SULFETOS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DE BIOLIXIVIAÇÃO DE METAIS PESADOS

Sulfeto	Kps
CdS	$1,0 \times 10^{-8}$
CuS	$8,0 \times 10^{-37}$
PbS	$7,0 \times 10^{-29}$
ZnS	$1,6 \times 10^{-23}$

Fonte: O'CONNOR, Rod. Fundamentos de Química. Harbra. São Paulo. 1977

5. CONCLUSÃO

- ◆ O lodo ativado utilizado não continha concentrações de metais pesados acima dos limites preconizados pela legislação internacional.
- ◆ O uso da técnica do lodo artificial, consorciada com a contaminação artificial por sulfetos dos metais estudados possibilitou um melhor controle de variáveis intervenientes na avaliação da bio-lixiviação.
- ◆ Foi confirmada a presença de *Thiobacillus ferrooxidans* no lodo ativado da ETE-Belém - Sanepar (Curitiba).
- ◆ O processo de bio-lixiviação apresentou eficiência média de 95% para o cádmio, chumbo e cobre, utilizando-se de cepas nativas do lodo, mas os parâmetros de potencial redox e pH não corresponderam.
- ◆ A bio-lixiviação não diminuiu as concentrações de nutrientes (N, P, K) do lodo ativado, não inviabilizando sua utilização agrícola.

6. GLOSSÁRIO

Acidofilismo (Acidophilism): Habilidade de crescer bem quando inoculado em meio à pH menor ou igual a 3. (HARRISON, apud ROSSI, 1994)

Adensamento (Thickening): Baixa força de separação dos sólidos da água, por gravidade ou flotação (EPA, 1984).

Autotrofismo (Autotrophism): Habilidade de crescer em um meio completamente inorgânico com dióxido de carbono como fonte de carbono (KETCHUM, 1988).

Bio-lixiviação (Bioleaching): É um processo de dissolução de rochas, concentrados produzidos por métodos minerais convencionais ou componentes de produtos metalúrgicos, catalisado por microrganismos adequados (ROSSI, 1990)

Conteúdo mole percentual Guanina + citosina - Mol% G+C : Entre as bactérias os valores mol% G+C varia de 24 - 75 e o valor é constante para um dado organismo. Bactérias intimamente relacionadas tem valores mol% G+C similares. No entanto é importante observar que dois organismos que tenham valores Mol% G+C próximos não são necessariamente relacionadas; isto é por devido a este valor não levar em conta o arranjo linear dos nucleotídeos no DNA (BERGEY, 1994).

Desidratação (Dewatering): Alta pressão/força de separação da água dos sólidos (EPA, 1984)

Efluente: Refere-se à água que sai do clarificador final, e deve estar livre de matéria orgânica dissolvida ou suspensa e conter o mínimo de componentes minerais como NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{3-} pois estes elementos podem induzir ao processo de eutrofização (Efluente ?).

Eletrodo combinado : Um sensor no qual o eletrodo sensor e o eletrodo de referência estão alojado em um corpo (Eletrodo combinado ?).

Eletrodo de Referência: É a metade do par de eletrodos que provê um potencial constante apesar da composição da solução. O potencial desenvolvido pelo eletrodo sensor é medido contra o potencial de referência para dar um potencial total do sistema que pode ser convertido para o nível dos elementos monitorados. Existem vários tipos de eletrodos de referência:

- Eletrodo-referência de calomelano: Tem um elemento de referência interno de mercúrio/cloreto de mercúrio (mercurous chloride). A solução de enchimento é geralmente KCl saturado, também pode ser cloreto de mercúrio saturado. Este eletrodo embora seja muito usado para pH, não é recomendado para uso com outros eletrodos íon-seletivo pois eles se equilibram mais vagarosamente que os eletrodos de prata/cloreto de prata após mudanças de temperatura.

- eletrodo-referência de prata/cloreto de prata: Tem um elemento de referência interno de prata e cloreto de prata. A solução de enchimento deve conter cloretos e ser saturada com respeito ao cloreto de prata. Soluções saturadas de KCl, 1M KCl são geralmente usadas. Este eletrodo, com melhores características térmicas que o de calomelano, são preferíveis para medidas precisas de pH e medidas íon-seletivas (Eletrodo de referência ?).

Equação de Nerst : Uma descrição matemática do comportamento de eletrodos:

$$E = E_x + 2,3 RT/nF \log A$$

E é o potencial total, em milivolts, desenvolvido entre o eletrodo-sensor e o eletrodo-referência; E_x é uma constante que depende principalmente do eletrodo de referência; $2,3 RT/nF$ é o fator de Nerst (R e F são constantes, n é a carga do íon, incluindo o sinal, T é a temperatura em graus Kelvin); e A é a atividade do íon ao qual o eletrodo está respondendo.

Fator de Nerst: o termo $2,3 RT/nF$ na equação de Nerst, que é igual (à T = 25°C) para 59.16 mV quando n = 1 e 29.58 mV quando n = 2, e que inclui o sinal da carga do íon no termo n. A equação de Nerst varia de acordo com a temperatura)

Influente: Se refere ao esgoto que chega à ETE para ser tratado.

IVL (Índice Volumétrico do lodo): É um índice utilizado para avaliar as condições de uma Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) num dado momento.

Lodo de esgoto (Wastewater Sludge): é um co-produto do tratamento do esgoto, contendo geralmente 93 á 99,5% de água, além de sólidos e substâncias dissolvidas que estavam presentes no esgoto e que foram transformados durante o processo de tratamento (EPA, 1984).

Lodo primário (Primary sludge): É gerado durante o tratamento primário do esgoto, remove os sólidos que se sedimentam mais facilmente. Este lodo contém 3 a 7% de sólidos; Geralmente a porcentagem de água pode ser facilmente diminuída por adensamento (EPA, 1984).

Lodo Secundário (Secondary Sludge): Geralmente denominado de "lodo de processo biológico", pois é gerado pelo processo secundário de tratamento biológico, incluindo os sistemas de lodo ativado e dos sistemas de crescimento aderido como os "trickling filters". O lodo secundário tem uma concentração baixa (0,5 a 2%) e é mais difícil de ser adensado e desidratado que o lodo primário.

Lodo Terciário (Tertiary Sludge): É produzido por processos avançados de tratamento, tais como a precipitação química e filtração. As características do lodo terciário dependem do processo de tratamento de esgoto que o gerou. Lodos químicos resultam destes processos que adicionam substâncias químicas como cal, polímeros orgânicos, alumínio e sais de ferro. A adição de cal ou polímeros melhora o adensamento e a desidratação (EPA, 1984) .

Mesofilismo (mesophilism): Habilidade de ter crescimento ótimo à temperaturas entre 20 a 50 graus celsius (KETCHUM, 1988)

Potencial Redox - Redox Potential (ORP): É o potencial desenvolvido por um eletrodo metálico quando colocado em uma solução contendo um elemento químico em dois estados de oxidação diferentes.

Quimiolitotrofismo (chemolithotrophism): Habilidade de ganhar toda sua energia da oxidação de compostos inorgânicos (KETCHUM, 1988)

SD₃₀ (Sludge decantation after 30 minutes): Teste rápido que avalia principalmente presença de bactérias filamentosas no lodo biológico.

SSV_{ta} (Sólidos em Suspensão no tanque de aeração): Método de avaliação dos sólidos em suspensão no lodo biológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKHTER, M. S. Trace metal analysis of sewage sludge and soils in Bahrain. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.51, p.147-152, 1990.
2. ALLOWAY, B. J. Heavy metals in soils. New Delhi, Blackie Academic & Professional, 1993. 339 p.
3. AMRHEIN, C.; MOSHER, P. A.; STRONG, J. E.; et. al. Heavy metals in the environment - trace metal solubility in soils and waters receiving deicing salts. *Journal of Environmental Quality*, v.23. p.219-226, . 1994.
4. APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, American Public Health Association, 1992.
5. ATTAR, E. N.; MALY, E. J. Acute toxicity of cadmium, zinc and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.11. p.191-196, 1982.
6. BALZER, W.; AHRENS, E. The effects of long term sewage sludge applications and resulting accumulations of heavy metals on the microbial activity in three different soils. *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten, Reihe Kongressberichte*. P.615-620, 1990.
7. BARBIER, D.; PERRINE, D.; DUHAMEL, C.; et. al. Parasitic Hazard with sewage sludge applied to land. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56. p.1420-1422, 1990.
8. BARON, J.; LEGRET, M.; ASTRUC, M. Study of interactions between heavy metals and sewage sludges. Determination of stability constants and complexation capacities of complexes formed with Cu and Cd. *Environmental Technology*, v.11. 151-162, 1990.
9. BERROW, M. L. ; BURRIDGE, J. C. Persistence of metal residues in sewage sludge treated soils over seventeen years. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.39. p.173-177, . 1990.
10. BERTHET, B.; AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; et. al. Fate of metals linked with sewage sludges or municipal refuses used as improvements in market gardening. *Water Science and Technology*, v.21. p.1917-1920, . 1989.
11. BOLDRINI, C. V. ; PEREIRA, D. N. Metais pesados na baia de Santos e estuários de Santos e São Vicente. *Ambiente*, v.1. p.118-127, 1987.
12. BORDIGNON, J. A., KLOSS, C. R., CHIARELLO, M. D., et. al. O cromo em alimentos - uma contribuição. *Divisão Técnica (Nutrimental)*. 55 p. 1987.
13. BRADDOCK, J. F.; LUONG, H. V.; BROWN, E. J. Growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from arsenic mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48. p.48-55, . 1984.

14. BROWN, S. M. ; OVERCAMP, T. J. A simple model for cadmium uptake for crops. 46th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, 46. 379-384, . 1992.
15. BUCHGRABER, K. ; SCHECHTNER, G. Effectiveness of sewage sludge on grassland, especially on soil and plants. Veröffentlichungen Bundesanstalt für Alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, . 35p, 1989.
16. BUGBEE, G. J.; FRINK, C. R.; MIGNEAULT, D. Growth of perennials and leaching of heavy metals in media amended with a municipal leaf, sewage sludge and street sand compost. Journal of Environmental Horticulture, v.9. p.47-50, 1991.
17. CALVET, R.; BOURGEOIS, S.; MSAKY, J. J. Some experiments on extraction of heavy metals present in soil. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 39. 31-45, 1990.
18. CARVALHO, F. M.; SILVANY-NETO, A. M.; LIMA, M. E. C.; et. al. Intoxicação por chumbo e cádmio em trabalhadores de oficinas para reforma de baterias em Salvador, Brasil. Rev. Saúde Publ., 19. 411-420, . 1985.
19. CETESB. Pseudomonas aeruginosa - Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos - L5.220. São Paulo. 1985.
20. CETESB. Microbiologia de lodos ativados (Apostila). São Paulo. 1992.
21. CHANEY, R. L. Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food-chains. Inorganic Contaminants in the Vadose Zone [edited by Bar Yosef, B.; Barrow, N. J.; Goldshmid, J.], . 140-158, . 1989.
22. CIMINO, G. ; CARISTI, C. Acute toxicity of heavy metals to aerobic digestion of waste cheese whey. Biological Wastes, v.33. p.201-210, 1990.
23. COUILLARD, D. ; CHARTIER, M. Removal of metals from aerobic sludges by biological solubilization in batch reactors. Journal of Biotechnology, v.20. p.163-180, . 1991a.
24. COUILLARD, D.; CHARTIER, M.; MERCIER, G. Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge. Bioresource Technology, v.36. p.293-302, . 1991b.
25. COUILLARD, D.; CHARTIER, M.; MERCIER, G. Effect of pH and oxido-reduction potential on biological solubilization of metals from aerobically digested sewage sludge. Environmental Technology, v.12. p.1095-1105, 1991c.
26. COUILLARD, D. ; MERCIER, G. Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge - bioreactors comparison. Environmental Pollution, v.66. p.237-252, 1990.
27. COUILLARD, D. ; MERCIER, G. Optimum residence time (in CSTR and airlift reactor) for bacterial leaching of metals from anaerobic sewage sludge. Water Research Oxford, v.25. p.211-218, 1991d.
28. DAWSON, P. S. S. Continuous cultivation of microorganisms. CRC Critical Reviews in Biotechnology, v.2. p.315-372, 1985.
29. DAZAI, H. Activated sludge method. In: . Tokyo. Chikyusya. P.8-65.

30. DIVE, D.; GABRIEL, L.; HANSSENS, O.; et. al. Studies on interactions between components of electroplating industry wastes: influence of nickel and calcium on interactions between cadmium, copper, chromium and zinc. *The Science of the Total Environment*, v.87/88. P.355-364, . 1989.
31. DIVE, D.; POMMERY, N.; LALANDE, M.; et. al. Cadmium complexation by humic substance: Chemical and ecotoxicological study with ciliate protozoan *Colpidium campylum*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, v.1163. p.9-21, 1982.
32. DIVE, D.; VASSEUR, P.; BEL, C.; et. al. Cadmium-zinc and cadmium-selenium interactions. A comparative study with *Olpidium Campylum* and *Photobacterium phosphoreum*. *J. Protozool.*, 30. V.65A-66A, 1983.
33. DIVE, D.; VASSEUR, P.; HANSSENS, P.; et. al. Studies on interactions between components of electroplating wastes. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, v.1607. p.23-34, 1988.
34. DOELMAN, P.; JANSEN, E.; MICHELS, M.; et. al. Effects of heavy metal in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensivity-resistance index, an ecologically relevant paramenter. *Biology and Fertility of soils*, v.13. p.185-190, 1994.
35. DOWDY, R. H.; LATTERELL, J. J.; HINESLY, T. D.; et. al. Trace metal movement in an aeric ochraqualf following 14 years of annual sludge applications. *Journal of Environmental Quality*, v.20. p.119-123, . 1991.
36. DUDKA, S. ; CHLOPECKA, A. Effect of solid-phase speciation on metal mobility and phytoavailability in sludge-amended soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.51. p.153-160, 1990.
37. EHRLICH, H. L.; BRIERLEY, C. L. Microbial mineral recovery. New York, McGraw-Hill, 454 p. 1990.
38. EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge; Final Rule and Proposed Rule - 40 CFR Parts 403 and 503. Washington. 1995.
39. FIGUEIREDO, M. A. S.; ALCANTARA, E. M.; RIBEIRO, L. D. Lixiviação do cobre em minério de baixo teor de sulfato férrico produzido via oxidação bacteriana. *Tecbahia*, v.9. p.17-21, 1994.
40. GARCIA, O. J. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Rev. Microbiol.* V.22. p.1-6, . 1991.
41. GILLER, K. & MCGRATH, S. Muck, metals and microbes. *New Scientist*, v.124. p.31-32, 1989.
42. GILLIES, J. A.; KUSHWAHA, R. L.; HWANG, C. P.; et. al. Heavy metal residues in soil and crops from applications of anaerobically digested sludge. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, v.61. p.11, . 1989.
43. GOURDON, R.; BHENDE, S.; RUS, E.; et. al. Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnology Letters*, v.12. p.839-842, . 1990.

44. GRUN, R. ; PUSCH, F. Heavy metals in agroecosystems: heavy metals in the soil-plant system after years of sewage sludge amendment on characteristic soils of the Weser-Ems area (FRG). *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft*, v.59. p.711-716, 1989.
45. GRUNEKLEE, C. E.; KERN, K. G.; MOLL, W. Heavy metal dynamics in trials with composted municipal waste in the Palatinate forest. *Allgemeine Forst und Jagdzeitung*, v.160. p.32-39, . 1989.
46. GUIDI, G. V.; PETRUZZELLI, G.; VALLINI, G., et. al. Plant productivity and heavy metal contamination. *Biocycle*, v.31. p.46-48, 1990.
47. HASSELBACH, G. Effects of long-term application of domestic wastes on the heavy metal transfer from soil to plant. III. Soil specific effects on the uptake and extraction of heavy metals. *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten, Reihe Kongressberichte*. p.281-286, 1990.
48. HIEROLD, W. Vertical distribution and spatial variability of heavy metals in contaminated soils of sewage farms. *Archiv fur Acker und Pflanzenbau und Bodenkunde*, v.34. p.297-305, 1990.
49. HIRSCH, P. R., JONES, M. J., MCGRATH, S. P., et. al. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii* populations. *Soil Biology and Biochemistry*, v.25. p.1485-1490, 1993.
50. HUTCHINS, S. R., DAVIDSON, M. S., BRIERLEY, J. A., et. al. Microorganisms in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* v.40. p.311-336, 1986.
51. IZSAKI, S., DEBRECZENI, I., BENESOCZKY, J. The effect of fertilizing leather factory sludge on the chromium content of soil, plant and yield. Protection of water quality from harmful emissions with special regard to nitrate and heavy metals. *Proceedings of the 5th International Symposium of CIEC* [edited by Welte, E.; Szabolcs, I.], p.353-356, 1989.
52. JEWEL, W. J. *Energy, Agriculture and Waste management*. Ann Arbor, Ann Arbor Science, 1975. 540.
53. JONES, C. A. & KELLY, D. P. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v.33. p.241-261, 1983.
54. KARAPANAGIOTIS, N. K.; STERRITT, R. M.; LESTER, J. N. Heavy metal binding by the polymeric organic fractions of sewage sludges. *Environmental Pollution*, v.67. p.259-278, 1990.
55. KASAN, H. C. ; BAECKER, A. A. W. An assessment of toxic metal biosorption by activated sludge from the treatment of coal-gasification effluent of a petrochemical plant. *Water Research Oxford*, v.23. p.795-800, 1989.
56. KELLER, L. It pays to protect. *Berater Information*, . 21-26, . 1989.
57. KETCHUM, P. A. *Microbiology: concepts and application*. Tokyo, John Wiley and Sons, 1988. .

58. KOOMEN, I. ; MCGRATH, S. P. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biology and Biochemistry*, v.22. p.871-873, 1990.
59. KORENTAJER, L. A review of the agricultural use of sewage sludge: benefits and potential hazards. *Water SA*, v.17. p.189-196, 1991.
60. KOUZELI-KATSIRI, A.; KARTSONAS, N.; PRIFTIS, A. Assessment of the toxicity of heavy metals to the anaerobic digestion of sewage sludge. *Environmental Technology Letters*, v.9. p.261-270, 1988.
61. LACEY, D. T. ; LAWSON, F. Kinetics of liquid-phase oxidation of ferrous sulphate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.12. p.29-50, 1970.
62. LAMBERT, D. H. ; WEIDENSAUL, T. C. Element uptake by mycorrhizal soybean from sewage-sludge-treated soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* v.55. p.393-398, 1991.
63. LANGENOHLE, T. ; WITTE, H. Impact of the planned sewage sludge ordinance on the use of sewage sludges in agriculture - the example of a utilization region in North Rhine Westphalia. *Korrespondenz Abwasser*, p.38. p.744-748,750,753, 1991.
64. LASKAUSKAITE, D. A. Abundance dynamics of protozoa in composted urban sewage sludge. *Destruction of organic matter in soil*, p.86-88, 1989.
65. LERCH, R. N.; BARBARICK, K. A.; SOMMERS, L. E.; et. al. Sewage sludge proteins as labile carbon and nitrogen sources. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.56. p.1470-1476, 1992.
66. LERCH, R. N.; BARBARICK, K. A.; WESTFALL, D. G.; et. al. Sustainable rates of sewage sludge for dryland winter wheat production. 1. Soil nitrogen and heavy metals. *Journal of Production Agriculture*, v.3. p.60-65, 1990a.
67. LEVINE, M. B.; HALL, A. T.; BARRETT, G. W.; et. al. Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. *Journal of Environmental Quality*, v.18. p.411-418, 1989.
68. LIN, H. C. Utilization of municipal refuse in organic agriculture. *Special Publication Taichung District Agricultural Improvement Station*, p.209-215, 1989.
69. LOWE, W. L. ; GAUDY, A. F. Modified extended aeration process for removal and recovery of cadmium from wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, v.34. p.600-608, 1989.
70. MILLER, E. W. ; MILLER, R. M. *Environmental Hazards: toxic waste and hazardous material: a reference handbook*. Santa Barbara, ABC-CLIO, 1991. p.286.
71. MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *J. Ann. Inst. Pasteur*, p.371-393, . 1941.
72. PESIC, B., OLIVER, D. J., WICHLACZ, P. An electrochemical method of measuring the oxidation rate of ferrous to ferric ion with oxygen in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.33. p.428-439, 1989.

73. PETRUZZELLI, G. Recycling wastes in agriculture: heavy metal bioavailability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.27. p.493-503, 1989.
74. REED, B. E.; CARRIERE, P. E.; MATSUMOTO, M. R. Applying sludge on agricultural land. *Biocycle*, v.32. p.58-60, 1991.
75. ROSSI, G. *Biohydrometallurgy*. New York, McGraw-Hill, 1990. 609.
76. SCHONBORN, W. ; HARTMANN, H. Bacterial leaching of metals from sewage sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.5. p.305-313, 1978.
77. SCOTT, J. A.; SAGE, G. K.; PALMER, S. J.; et. al. Cadmium adsorption by bacterial capsular polysaccharide coatings. *Biotechnology Letters*, v.8. p.711-714, 1986.
78. SHAY, M. A. ; ETZEL, J. E. Treatment of metal-containing wastewaters by carbon adsorption of metal-chelate complexes. 46th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, v.46. p.563-569, 1992.
79. SHRIVASTAVA, G. K. & SINGH, V. P. Uptake, accumulation and translocation of cadmium and zinc in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Plant Physiology and Biochemistry* New Delhi, v.16. p.17-22, 1989.
80. SILVERMAN, M. P. ; LUNDGREN, D., G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, v.77. p.642-647, 1959.
81. SPRAGUE, J. B. ; RAMSAY, B. A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J. Fish. Res.* v.22. p.425-432, . 1965.
82. SRIKANTH, R. ; REDDY, S. R. P. Lead, cadmium and chromium levels in vegetables grown in urban sewage sludge - Hyderabad, India. *Food Chemistry*, v.40. p.229-234, 1991.
83. STAHR, K. Analysis of the mobility of nutrients and trace elements in soils. *Bulletin Bodenkundliche Gesellschaft der Schweiz*, p.5-15, 1989.
84. SUYAMA, K.; FUKAZAWA, Y.; UMETSU, Y.; A new biomaterial, hen egg shell membrane, to eliminate metal ion from their dilute waste solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.47. p.871-880, 1994.
85. TABITA, F. R. Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiological review*, v.52. p.155-189, 1988.
86. TORMA, A. E. Biohydrometallurgy as an emerging technology. *Biotechnol. Bioengng. Symp.* v.16. p.49-63, 1986.
87. TUOVINEN, O. H. ; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* v.88. p.285-298, 1973.
88. TYAGI, R. D.; BLAIS, J. F.; AUCLAIR, J. C. Bacterial leaching of metals from sewage sludge by indigenous iron-oxidizing bacteria. *Environmental Pollution*, v.82. p.9-12, 1992.

89. TYAGI, R. D.; COUILLARD, D.; TRAN, F. T. Heavy metals removal from anerobically digested sludge by chemical and microbiological methods. *Environmental Pollution*, v.50. p.295-316, 1988.
90. TYAGI, R. D.; COUILLARD, D.; TRAN, F. T. Studies on microbial leaching of heavy metals from municipal sludge. *Water Science and Technology*, v.22. p.229-238, 1990.
91. URENHA, L. C. ; ALLI, R. DE C. P. Biometalurgia de minério de cobre da mina caraiba (Ba). Relatório Técnico - IPT. 16p. 1990.
92. VAISBICH, S.; PINTO, M. L. M.; BORZANI, W. Lixiviação bacteriana de rejeito de minério de cobre de Camaquã pela ação de bactéria isolada do próprio minério. *Rev. Bras. Tecnol.* v.10. p.298-302, 1979.
93. VANDERZANT, C. ; SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 1992. 1219p.
94. VENKOBACHAR, C. Metal removal by waste biomass to upgrade wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, v.22. p.319-320, 1990.
95. WEBBER, M. D.; KOKE, A.; TJELL, J. C. A review of current sludge use guidelines for the control of heavy metal contamination in soils. 1983.
96. WENZL, R.; BURGSTALLER, W.; SCHINNER, F. Extraction of zinc, copper and lead from a filter dust by yeasts. *Biorecovery*, v.2. p.1-13, 1990.
97. WILD, S. R.; OBBARD, J. P.; MUNN, C. I.; et. al. The long-term persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural soil amended with metal-contaminated sewage sludges. *Science of the Total Environment*, v.101. p.235-253, 1991.
98. WONG, L. T. K. ; HENRY, J. G. Bacterial leaching of heavy metals from anaerobically digested sludge. *Biotreatment systems, Volume II.* [edited by Wise, D.L.], p.125-169, 1988.